
CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

It is a detecting method of cytosine methylation in DNA,

- a) Operation steps in which a denaturation reagent and/or a solvent, and at least one sort of radical scavengers exist in that which incubates with a solution of a bisulfite (= hydrogen sulfite, 2 *****) in a genomic DNA probe between a 0.1 mol/l. density range and 6 mol/l.,
- b) Operation steps with which a processing DNA probe is diluted in water or solution,
- c) Operation steps by which a DNA probe is amplified by a polymerase reaction,
- d) A method, wherein arrangement changes to what extent to a genomic DNA probe and mere operation steps which are detected and reason a methylation state of at least one seat in a genomic DNA probe and ** are carried out by processing by Step a.

[Claim 2]

A method according to claim 1, wherein a denaturation reagent and/or a solvent are chosen from the following compound group or a list of compounds :

Polyethylene-glycol dialkyl ether, dioxane, and a substituted derivative, Urea or a derivative, acetonitrile, the primary alcohol, secondary alcohol, Tertiary alcohol, diethylene-glycol dialkyl ether, triethylene glycol dialkyl ether, Tetraethylene glycol dialkyl ether, pentaethylene glycol dialkyl ether, hexa ethylene glycol dialkyl ether, DMSO, THF.

[Claim 3]

A method according to claim 1 or 2, wherein a radical scavenger is chosen from the following compound group :

Di-, trihydroxy benzene, a green tea extract (green tea extract), PIKUNOGE Norian (pine bark extract), ginkgo nut 2 leaf extract (EGb761), Various fruit extracts and a flavonoid mixture (GNLD) of a vegetable extract, A bio-normalizer (Sun-O), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (NORUJIHIDO log noise rate acid), TOROROKUSU (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman 2-carboxylic acid), 2,6-di-tert-butylphenol, 4-methyl-di-tert-butylphenol, 4-methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vitamin C, vitamin E, the vitamin Q. Hydroquinone, ubiquinone, lignan, a hydroxyterpene, flavonoid, Curcumin, tannin, retinoic-acid compound, and germanium-132 BISUBETA carboxyethyl germanium SESUKIOKISHIDO, hyperoxidation dismutase (SOD), hyperoxidation catalase, an alpha naphthoflavone, JI (2-methyl-5-chlorophenyl) dithio NETO and Cu(II) derivative, mebendazole, CS (chloroform solubility) alkaloid extract, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthoquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthoquinone, A 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone, A 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthoquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-

anthraquinone,
 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 3-bromine 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)- Indang 1,3-dione,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy- 3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)- Indang 1-one,
 A 3,3-**- [indene- 1-one [2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-]]-3-yl,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3,5 - jib ****- 4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 3-bromine 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthraquinone,
 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1,3-diol,
 A 3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1-oar,
 4 -(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4 -(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- A benzoate,
 4 -(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)-benzoic acid,
 4 -(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4 -(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl-azo)- A benzoate,
 4 -(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl-azo)- Benzoic acid,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro cyclopenta[b] naphthalene 1,2-dione,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro

anthracen-3H-1,2,4-trione,

2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 5-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 6-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone.

[Claim 4]

A method of above-mentioned claim 1 thru/or 3 denaturalizing thermally [before a genomic DNA probe's processing] given in any 1 paragraph.

[Claim 5]

Step c.

a) A partial step of amplification by at least one primer pair of various arrangement which carries out a hybrid to a pretreatment DNA probe by claim 1 nonspecific, and one or more amplifiers produce from there at an PCR step before PCR,

b) or [that it is the same as a part of pretreatment DNA probe [(+) chain or (-) chain] by claim 1 respectively] -- or it being complementary and, a partial step of PCR amplification of output formed by pre-amplification by a primer of various arrangement which carries out a hybrid to DNA to be amplified specifically, and a method according to claim 1 coming out and carrying out.

[Claim 6]

A method of above-mentioned claim 1 thru/or 5, wherein amplification of two or more DNA portions is carried out within a reaction vessel given in any 1 paragraph.

[Claim 7]

A method of above-mentioned claim 1 thru/or 6, wherein heat-resistant DNA polymerase is used for a polymerase reaction given in any 1 paragraph.

[Claim 8]

A method of above-mentioned claim 1 thru/or 7, wherein desulfonation of DNA is carried out in front of Step c of claim 1 given in any 1 paragraph.

[Claim 9]

The hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array for detection of pretreatment DNA, and it is a continuation to it.

a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide under formation of a double chain, A partial step which adjoins a position from which said hybridization oligonucleotide should be directly investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at an interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide,

(b) An oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by one nucleotide at least using polymerase, A method of above-mentioned claim 1 thru/or 8 which has a sign which can detect this nucleotide and is characterized by carrying out a partial step for which said extension depends on a methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe, and ** given in any 1 paragraph.

[Claim 10]

The hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array for detection of pretreatment DNA, and it is a continuation to it.

a) The hybrid of the one set of an oligonucleotide is carried out to amplification genomic DNA under formation of a double chain, A set of this oligonucleotide consists of two kinds of kinds, And a position from which a hybridization oligonucleotide of the 1st sort should be directly investigated about methylation of said oligonucleotide in a genomic DNA probe at an interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide is adjoined, And the hybrid of the 2nd oligonucleotide of the 2nd sort is carried out to the 2nd field of a target molecule, A partial step into which 5' end of an oligonucleotide of the 2nd sort is separated from 3' end of a hybridization oligonucleotide of the 1st sort by size of each nucleotide, or a crevice to ten nucleotides as a result in a part of said selected position,

(b) An oligonucleotide of the 1st sort which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by the number of a nucleotide which is between 3' end of an oligonucleotide of the 1st sort, and 5' end of an oligonucleotide of the 2nd sort at the maximum using polymerase, A partial step for which said extension depends on a methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe,

(c) An oligonucleotide of the 1st sort elongated by polymerase reaction which it incubates under existence of ligase and an oligonucleotide adjoins, So that an oligonucleotide of the 2nd sort may be combined and 3' end which has the existing 3' hydroxy function of an oligonucleotide elongated here may adjoin 5' end of an oligonucleotide of the 2nd sort directly, A method of claim 1 thru/or 8 of given in any 1 paragraph, wherein a partial step from which an associated production thing is obtained by it, and ** are carried out, when extension of an oligonucleotide of the 1st sort is performed at a precedence step.

[Claim 11]

A method according to claim 10, wherein an oligonucleotide of the 1st sort and/or a used oligonucleotide of the 2nd sort which were used contain either the base T, A, and C or the base T, A, and G.

[Claim 12]

The hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array for detection of pretreatment DNA, and it is a continuation to it.

(a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide under formation of a double chain, A partial

step by which a hybrid is carried out to a position from which said hybridization oligonucleotide should in part or all be investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at the 3' end of said oligonucleotide,

(b) When the hybrid of the oligonucleotide is beforehand carried out without a base deficit pair to *****-ed at the 3' end of said oligonucleotide, A partial step which is elongated by one nucleotide at least using polymerase, and has a sign which can detect at least one nucleotide and for which said extension depends on a methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe, A method of claim 1 thru/or 8 given in any 1 paragraph ***** (ing).

[Claim 13]

A method of claim 1 thru/or 12 given in any 1 paragraph having a sign detectable for detection of PCR output, extension output, and/or an associated production thing.

[Claim 14]

A method of claim 1 thru/or 13 of given in any 1 paragraph, wherein a sign is fluorescent labeling.

[Claim 15]

A method of claim 1 thru/or 14 of given in any 1 paragraph, wherein a sign is radionuclide.

[Claim 16]

A method of claim 1 thru/or 13 of given in any 1 paragraph, wherein a sign of a nucleotide is a disengageable mass sign detectable with a mass spectrometer.

[Claim 17]

A method of claim 1 thru/or 13 given in any 1 paragraph which PCR output, extension output, and/or an associated production thing are detected with a mass spectrometer on the whole, and is characterized by what is clearly characterized with mass of said output by it.

[Claim 18]

A method of claim 1 thru/or 13 of given in any 1 paragraph, wherein one fragmentation each of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is detected with a mass spectrometer.

[Claim 19]

A method according to claim 18, wherein fragmentation of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is generated by digestion by one piece, two or more exonucleases, or endonuclease.

[Claim 20]

A method given in claims 18 and 19, wherein fragmentation generated for better detectability in a mass spectrometer has net charge positive or negative. [each]

[Claim 21]

PCR output, extension output, and/or an associated production thing use matrix care laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI-TOF), Or a method of above-mentioned claim 1 thru/or 20 detecting and visualizing using electronic spray mass spectrometry (ESI) given in any 1 paragraph.

[Claim 22]

Genomic DNA is obtained from a DNA probe and a source of the origin of DNA, for example A cell strain, A method of above-mentioned claim 1 thru/or 21 which includes tissue of blood, a sputum, facilities, urine, cerebrospinal fluid, a paraffin thicket organization, for example, an eye, intestines, the kidney, a brain, the heart, a prostate gland, a lung, an udder, or liver, an organization slide, and possible combination of all them given in any 1 paragraph.

[Claim 23]

In use of a method of above-mentioned claim 1 thru/or 22 for diagnosis of a disadvantageous result for a patient or an individual, and/or prediction given in any 1 paragraph, said disadvantageous result -- following category: -- drugs operation; which is not desirable -- cancer disease; -- CNS malfunction. obstacle or illness; -- aggression syndrome or action obstacle; -- clinical, psychological, and social a conclusion; psychogender obstacle and personality sexual disorder; senile dementia, and/or an associative syndrome; cardiovascular disease of a brain disorder. Malfunction and an obstacle; Malfunction of a gastroenteric region, an obstacle, or malfunction of the illness; respiratory system, An obstacle or an illness; An injury, inflammation, infection, immunity, and/or malfunction of the body as unusual [in a prognosis; growth process], An obstacle or an illness; use of a method belonging to at least one of the skin, muscles, connective tissue or a bony malfunction, an obstacle or illness; internal secretion and metabolic dysfunction, an obstacle, an illness; headache, or the sexual malfunction.

[Claim 24]

Use of a method of above-mentioned claim 1 thru/or 23 for investigation of distinction of a cellular type or an organization or cell differentiation given in any 1 paragraph.

[Claim 25]

A kit comprising:

A reagent containing a bisulfite.

A denaturation reagent or a solvent.

A radical scavenger and a primer for manufacture of an amplifier.

A guide for implementation of assay of claim 1 thru/or 22 given in any 1 paragraph.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

This invention relates to the detecting method of the cytosine methylation in DNA.

[0002]

The observation levels often studied in molecular biology by methodological development in recent years are the gene itself, translation to RNA of this gene, and protein produced from there. How and when the activity of a specific cell and the specific gene of an in-house and inhibition are controlled by the ability of which gene to turn on a switch in progress of a manifestation of an individual can give correlation with a gene, or the scale and the characteristic of methylation of a genome. In the limitation, the state of a **** object appears in the methylation pattern from which each gene or the genome changed.

[0003]

5-methylcytosine is a base embellished with a covalent bond most frequently within DNA of an eukaryotic cell. This base has played the role set, for example to regulation, genomic imprinting, and tumorigenesis of transfer. Therefore, identification of 5-methylcytosine as a component of gene information is dramatically important. However, since a 5-methylcytosine position has the base pair action as cytosine with the same 5-methylcytosine, it cannot be identified by sequencing. The epigenesis information which has 5-methylcytosine in PCR amplification will be lost thoroughly.

[0004]

The comparatively new examination method of DNA on the 5-methylcytosine frequently applied

to during this period is converted into uracil which is equivalent to thymidine by the base pair action of uracil by the alkaline hydrolysis following it based on the specific reaction of cytosine and a bisulfite. 5-methylcytosine is not embellished under said condition to it. Methylcytosine undistinguishable from cytosine by the hybridization action to the origin first DNA by that cause as cytosine which now remains uniquely by the art of the molecular biology of a "conventional method", For example, it is converted so that amplification and hybridization, or sequencing can detect. All of such art are based on the base pair used extensively now. The advanced technology about susceptibility is defined by the method of confining *-ed DNA in an agarose matrix, This blocks diffusion and restoration (a bisulfite reacts only to a single stranded DNA) of DNA, and it is replaced by dialysis with all the quick sedimentation steps and washing steps (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). By this method, each cell can be investigated and the possibility of this method is explained concretely. To be sure, although only the field of conventional each is investigated even to about 3000 base pair length, overall investigation of the cell covering thousands of possible methylation analysis is impossible. However, the very small fragmentation which consists of the amount of samples also with few this method is certainly unanalyzable. This is lost in spite of the nonproliferation by a matrix.

[0005]

The outline about an another publicly known possibility of detecting 5-methylcytosine, : which can be read in the following outline paper -- Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, and 2255.

[0006]

Bisulfite art is used only in research except for conventional some (for example, Zechnick, M. et al., Eur.J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98). However, a specific portion with a known always short gene is amplified by bisulfite processing, . [whether sequencing (Olek, A. and Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) is carried out thoroughly and] Or each cytosine position. "a primer elongation reaction" (Primer-Extension-Reaktion) (Gonzalzo, M. L. and Jones, P. A., Nucl. AcidsRes. 1997, 25, and 2529-2531.) It is detected by WO-Patent 9500669 or enzyme cutting (Xiong, Z. and Laird, P. W., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2532-2534). In particular, detection by hybridization is also indicated (Olek et al., WO 9928498).

[0007]

: whose publication of others which have taken up application of the bisulfite art for the methylation detection in each gene is as follows -- Xiong, Z. and Laird, and P. W. (1997). Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. and Jones, and P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. and Clark, and S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. and others (1995), Gene 157, 261; WO 9746705, WO 9515373, and WO 45560.

[0008]

The view about the advanced technology in manufacture of oligomer arrangement, From the spontaneous generation study special number (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) published in January, 1999. Then, it can read in U.S. Pat. No. 5994065 about the manufacturing method of the solid support for a target molecule like the oligonucleotide by the literature quoted and the reduced nonspecific background signal.

[0009]

As for many, the fluorescent-labeling probe is used for the scan of an immobilization DNA sequence. Easy incorporation of Cy3 and Cy5 coloring matter is especially suitable for fluorescent labeling at 5'OH of each probe. Detection of the fluorescence of a hybrid probe is

performed, for example via a confocal microscope. The coloring matter Cy3 and Cy5 can be commercially obtained along with many of other coloring matter.

[0010]

Matrix care laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI-TOF), it is very highly efficient development for analyzing biomolecule (Karas, M. and Hillenkamp, and F. (1988).) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60 : 2299-2301. An analysis object is embedded into an extinction matrix. A matrix evaporates by a short laser pulse and it is conveyed into the gaseous phase, without fragmentation-izing an analysis object molecule in this way. Ionization of an analysis object is attained by the collision with a matrix molecule. The impressed voltage accelerates ion into the flight pipe of no magnetic field. Since the mass of said ion differs, ion is accelerated by various strength. Smaller ion reaches a detector more quickly than larger ion.

[0011]

MALDI-TOF spectroscopy is very well suitable in the analysis of peptide and protein. some analyses of nucleic acid are difficult (Gut, I. G. and Beck, and S. (1995).) DNA and Matrix Assisted. Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends1: 147-157. In the case of nucleic acid, in about 100 times, susceptibility gets worse than peptide, and it decreases too much with the increase in a fragsize. In the case of the nucleic acid which has the backbone so much electrified in negative, the ionization process by a matrix is inefficient-like intrinsically. In the case of MALDI-TOF spectroscopy, selection of a matrix plays a notably important role. About desorption of peptide, highly efficient matrices are found out very much [some which produce very detailed crystallization]. In the case of DNA, the matrices which surely attract some interest in the meantime existed, but the difference in susceptibility was not reduced by it. The difference in this susceptibility can be made to reduce by embellishing said DNA chemically so that DNA may be similar to peptide. The phosphorothioate nucleic acid in which the phosphate of the usual backbone was replaced by the thiophosphoric acid salt, it is convertible into DNA of a neutral electric charge by easy alkylation chemicals (Gut, I. G. and Beck, and S. (1995).) A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Necleic Acids Res. 23 : 1367-1373. Coupling of the "electric charge sign" (charge tags) to this ornamentation DNA is produced in improvement in the susceptibility for the same quantity as what is found out by the case where a total amount is peptide. charge tagging One strong point in which I accept it is that the stability of the analysis to the impurity which makes detection of a non-modified substrate very difficult improves.

[0012]

Genomic DNA is obtained from DNA of cell -, organization -, or other experiment probes with a standard method. "This standard method, the volume flitches and for Maniatis, a molecular-cloning:experiment manual, It is found out by reference like 1989" (Molecular Cloning:[Fritsch und Maniatis eds. and] A Laboratory Manual, 1989).

[0013]

Urea improves the efficiency of the bisulfite processing before sequencing of 5-methylcytosine in genomic DNA (). [Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA (1998) and] Nucleic Acids Res. 26 : 5009-5010.

[0014]

Therefore, the technical problem of this invention is providing the detecting method of the cytosine methylation in DNA which conquers the fault of the advanced technology.

[0015]

In what is provided with the detecting method of the cytosine methylation in DNA, this technical problem is solved by carrying out the following operation steps. :

- a) Operation steps in which a denaturation reagent and/or a solvent, and at least one sort of radical scavengers exist in that which incubates with the solution of a bisulfite (= hydrogen sulfite, 2 *****) between density range 0.1 mol/l and 6 mol/l in a genomic DNA probe.
- b) Operation steps with which a processing DNA probe is diluted in water or solution.
- c) Operation steps by which a DNA probe is amplified by a polymerase reaction.
- d) Arrangement changes with processings by Step a to what extent to a genomic DNA probe, and it is the mere operation steps which are detected and reason the methylation state of at least one seat in a genomic DNA probe.

[0016]

It is advantageous that the denaturation reagent and/or the solvent are chosen from the following compound group or the list of compounds in this case according to this invention. :

Polyethylene-glycol dialkyl ether, dioxane, and a substituted derivative, Urea or a derivative, acetonitrile, the primary alcohol, secondary alcohol, Tertiary alcohol, diethylene-glycol dialkyl ether, triethylene glycol dialkyl ether, Tetraethylene glycol dialkyl ether, pentaethylene glycol dialkyl ether, hexa ethylene glycol dialkyl ether, DMSO, THF.

[0017]

It is advantageous that the radical scavenger is chosen from the following compound group in this case. :

Di-, trihydroxy benzene, a green tea extract (green tea extract), PIKUNOGE Norian (pine bark extract), ginkgo nut 2 leaf extract (EGb761), Various fruit extracts and the flavonoid mixture (GNLD) of a vegetable extract, A bio-normalizer (Sun-O), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (NORUJIHIDO log noise rate acid), TOROROKUSU (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman 2-carboxylic acid), 2,6-di-tert-butylphenol, 4-methyl-di-tert-butylphenol, 4-methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vitamin C, vitamin E, the vitamin Q. Hydroquinone, UBIKINON, lignan, a hydroxyterpene, flavonoid, Curcumin, tannin, retinoic-acid compound, and germanium-132 BISUBETA carboxyethyl germanium SESUKIOKISHIDO, hyperoxidation dismutase (SOD), hyperoxidation catalase, an alpha naphthoflavone, JI (2-methyl-5-chlorophenyl) dithio NETO and Cu(II) derivative, mebendazole, CS (chloroform solubility) alkaloid extract, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthoquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthoquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthoquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone, 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone, 3-bromine 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-

anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)- Indang 1,3-dione,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy- 3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)- Indang 1-one, 3,3-**- [indene- 1-one [2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-]]-3-yl,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3,5 - jib ****- 4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 3-bromine 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthraquinone,
 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1,3-diol,
 3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1-oar,
 4 -(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4 -(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoate,
 4 -(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)-benzoic acid,
 4 -(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4 -(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl-azo)- Benzoate,
 4 -(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl-azo)- Benzoic acid,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro cyclopenta[b] naphthalene 1,2-dione,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro anthracen-3H-1,2,4-trione,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,

2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 [0018]

It is advantageous to denaturalize thermally in this case, according to this invention, before a genomic DNA probe's processing.

[0019]

In particular, Step c according to this invention,

a) The partial step of the amplification by at least one primer pair of various arrangement which carries out a hybrid to the pretreatment DNA probe by claim 1 nonspecific, and one or more amplifiers produce from there at an PCR step before PCR,

b) or [that it is the same as a part of pretreatment DNA probe [(+) chain or (-) chain] by claim 1 respectively] -- or it being opposite phase assistant-like and, It is advantageous to carry out at the partial step of the PCR amplification of the output formed by the pre-amplification by the primer of various arrangement which carries out a hybrid to DNA to be amplified specifically.

[0020]

It is advantageous that amplification of two or more DNA portions is carried out within a reaction vessel according to this invention.

[0021]

It is advantageous that heat-resistant DNA polymerase is used according to this invention for a polymerase reaction.

[0022]

It is advantageous that desulfonation of DNA is especially carried out in front of Step c of the method by this invention according to this invention.

[0023]

It is advantageous that the hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array for detection of pretreatment DNA, and the following partial step is carried out following it. :

[0024]

a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide under formation of a double chain, The partial step which adjoins the position from which said

hybridization oligonucleotide should be directly investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at the interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide.

(b) The partial step which the oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by one nucleotide at least using polymerase, and has a sign which can detect this nucleotide and for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

[0025]

It is advantageous that the hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array according to this invention for detection of pretreatment DNA, and the following partial step is carried out following it. :

a) The hybrid of the one set of an oligonucleotide is carried out to amplification genomic DNA under formation of a double chain, The set of this oligonucleotide consists of two kinds of kinds, And the position from which the hybridization oligonucleotide of the 1st sort should be directly investigated about methylation of said oligonucleotide in a genomic DNA probe at the interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide is adjoined, And the hybrid of the 2nd oligonucleotide of the 2nd sort is carried out to the 2nd field of a target molecule, The partial step into which 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort is separated from 3' end of the hybridization oligonucleotide of the 1st sort by the size of each nucleotide, or the crevice to ten nucleotides as a result in the part of said selected position.

(b) The oligonucleotide of the 1st sort which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by the number of the nucleotide which is between 3' end of the oligonucleotide of the 1st sort, and 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort at the maximum using polymerase, The partial step for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

(c) It is combined by the oligonucleotide of the 1st sort elongated by the polymerase reaction which it incubates under existence of ligase and an oligonucleotide adjoins, and the oligonucleotide of the 2nd sort, and by it. The partial step from which an associated production thing is obtained when extension of the oligonucleotide of the 1st sort is performed at a precedence step so that 3' end which has the existing 3' hydroxy function of the oligonucleotide elongated here may adjoin 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort directly.

[0026]

In this case, especially the thing for which the oligonucleotide of the 1st sort and/or the used oligonucleotide of the 2nd sort which were used contain either the base T, A, and C or the base T, A, and G according to this invention is advantageous.

[0027]

It is advantageous that the hybrid of the PCR output is carried out on an oligonucleotide array according to this invention for detection of pretreatment DNA, and the following partial step is carried out following it. :

(a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide under formation of a double chain, The partial step by which a hybrid is carried out to the position from which said hybridization oligonucleotide should in part or all be investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at the 3' end of said oligonucleotide.

(b) When the hybrid of the oligonucleotide is beforehand carried out without a base deficit pair to *****-ed at the 3' end of said oligonucleotide, The partial step which is elongated by one

nucleotide at least using polymerase, and has a sign which can detect at least one nucleotide and for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

[0028]

It is also advantageous to have a sign detectable for detection of PCR output, extension output, and/or an associated production thing according to this invention. In this case, it is advantageous that a sign is fluorescent labeling and/or a sign is especially radionuclide. In this case, it is advantageous that the sign of a nucleotide is especially a disengageable mass sign detectable with a mass spectrometer.

[0029]

It is also advantageous that PCR output, extension output, and/or an associated production thing are detected with a mass spectrometer on the whole, and characterize clearly with the mass of said output by it especially. It is also advantageous that one fragmentation each of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is detected with a mass spectrometer according to this invention.

[0030]

As for the method by this invention, it is also advantageous that it is characterized by the fragmentation of PCR output, extension output, and/or an associated production thing being generated by digestion by two or more one piece, exonucleases, or endonucleases.

[0031]

It is advantageous that the fragmentation generated for the better detectability in a mass spectrometer has net charge positive or negative. [each]

[0032]

It is advantageous that PCR output, extension output, and/or an associated production thing are detected and visualized using electronic spray mass spectrometry (ESI), using matrix care laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI-TOF) especially perfect.

[0033]

The method by this invention is obtained from a DNA probe by genomic DNA, and the source of the origin of DNA, For example, it is also advantageous to include the tissue of a cell strain, blood, a sputum, facilities, urine, cerebrospinal fluid, a paraffin thicket organization, for example, an eye, intestines, the kidney, a brain, the heart, a prostate gland, a lung, an udder, or liver, an organization slide, and the possible combination of all them.

[0034]

In use of the method by this invention for diagnosis of the result for a patient or an individual with one more disadvantageous purpose of this invention, and/or prediction, said disadvantageous result -- following category: -- drugs operation; which is not desirable -- cancer disease; -- CNS malfunction. obstacle or illness; -- aggression syndrome or action obstacle; -- clinical, psychological, and social the conclusion; psychogender obstacle and personality sexual disorder; senile dementia, and/or associative syndrome; cardiovascular disease of a brain disorder. Malfunction and an obstacle; The malfunction of a gastroenteric region, an obstacle, or the malfunction of the illness; respiratory system, An obstacle or the illness; An injury, inflammation, infection, immunity, and/or the malfunction of the body as unusual [in a prognosis; growth process], An obstacle or the illness; it is use of the method belonging to at least one of the skin, muscles, connective tissue or a bony malfunction, an obstacle or illness; internal secretion and metabolic dysfunction, an obstacle, an illness; headache, or the sexual malfunction.

[0035]

The purpose of this invention is use of the method by this invention for investigation of distinction of a cellular type or an organization or cell differentiation.

[0036]

Finally, another purpose of this invention is a kit which consists of the reagent containing a bisulfite, a denaturation reagent or a solvent, the radical scavenger for manufacture of an amplifier and a primer, and a guide for implementation of assay by the method by this invention.

[0037]

This invention provides the detecting method which can automate the methylcytosine containing only a pipette measurement step. the simple nature of processing of the efficiency of the existing method by it, quality, and cost -- and it is improved especially about a throughput.

[0038]

The detecting method which can automate the methylcytosine in a genomic DNA probe is indicated.

[0039]

Genomic DNA to be analyzed is obtained from the combination in which all tissues of the source of the origin of the conventional method of DNA, for example, a cell strain, blood, a sputum, facilities, urine, cerebrospinal fluid, a paraffin thicket organization, for example, an eye, intestines, the kidney, a brain, the heart, a prostate gland, a lung, an udder, or liver, organization slides, and they have advantageously possible genomic DNA.

[0040]

At the 1st step of this method, used DNA advantageously by a bisulfite (= a 2 bad-second ghost, bad second acid water matter). Various bases occur about a base pair action, and it is processed so that another side and all the cytosine which is not methylated to the 5th place of a base so that it may remain without methylation cytosine's changing the 5th place may change.

[0041]

A genomic DNA probe denaturalizes thermally before processing advantageously especially.

[0042]

When a bisulfite is used between a 0.1 mol/l. density range and 6 mol/l for a reaction, addition is performed to a non-methylating cytosine base. Especially in the case of the method by this invention, a denaturation reagent or a solvent, and a radical scavenger must exist.

[0043]

In this case, a following compound group or compounds is applicable advantageously as a denaturation reagent or a solvent.

[0044]

Polyethylene-glycol dialkyl ether, dioxane, and a substituted derivative, Urea or a derivative, acetonitrile, the primary alcohol, secondary alcohol, Tertiary alcohol, diethylene-glycol dialkyl ether, triethylene glycol dialkyl ether, Tetraethylene glycol dialkyl ether, pentaethylene glycol dialkyl ether, hexa ethylene glycol dialkyl ether, DMSO, or THF.

[0045]

As a radical scavenger, the compound group enumerated on the list 1 or its derivative group is preferably suitable. Next, alkaline hydrolysis makes conversion of the non-methylating cytosine -**** LEO base in uracil produce following it.

[0046]

A processing DNA probe is diluted with the 2nd method step in water or solution.

Advantageously, desulfonation (10 to 30 minutes, 90 to 100 **) of DNA is carried out with an

alkaline pH value following it.

[0047]

the 3rd step of this method -- a DNA probe -- polymerase chain reaction -- it is advantageously amplified by heat-resistant DNA polymerase. Amplification of two or more DNA portions is preferably performed in a reaction vessel.

[0048]

This method step is preferably carried out at 2 partial steps. This carries out the hybrid of the pretreatment DNA probe nonspecific, and is started by the amplification using at least one primer pair of various base sequences which obtains one or more amplifiers from there at an PCR step before PCR. Then, PCR amplification of the output formed by pre-amplification is carried out by the primer of various base sequences, and this is the same as the portion of a pretreatment DNA probe [(+) chain or (-) chain] respectively, or is opposite phase assistant-like, and carries out the hybrid of the DNA to be amplified specifically.

[0049]

In this case, it is clear that the above pre-amplification is carried out as a primer elongation reaction which does not often need heat-resistant polymerase as an PCR reaction.

[0050]

It is detected to what extent arrangement changed with processings with the reagent containing a bisulfite to the genomic DNA probe at the last method step, and the methylation state of at least one seat in a genomic DNA probe is reasoned.

[0051]

The hybrid of the PCR output is especially carried out on an oligonucleotide array advantageously for detection.

[0052]

In the advantageous modification mode of this method, the following partial step is carried out after the hybrid on an oligonucleotide array. :

a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide under formation of a double chain, The partial step which adjoins the position from which said hybridization oligonucleotide should be directly investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at the interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide.

(b) The partial step which the oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by one nucleotide at least using polymerase, and has a sign which can detect this nucleotide and for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

[0053]

In another advantageous modification mode of this method, the following partial step is carried out after a hybrid on an oligonucleotide array. :

a) The hybrid of the one set of an oligonucleotide is carried out to amplification genomic DNA under formation of a double chain, The set of this oligonucleotide consists of two kinds of kinds, And the position from which the hybridization oligonucleotide of the 1st sort should be directly investigated about methylation of said oligonucleotide in a genomic DNA probe at the interval to ten bases in the 3' end of said oligonucleotide is adjoined, And the hybrid of the 2nd oligonucleotide of the 2nd sort is carried out to the 2nd field of a target molecule, The partial step into which 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort is separated from 3' end of the hybridization oligonucleotide of the 1st sort by the size of each nucleotide, or the crevice to ten

nucleotides as a result in the part of said selected position.

(b) The oligonucleotide of the 1st sort which has the known arrangement of n nucleotide is elongated by the number of the nucleotide which is between 3' end of the oligonucleotide of the 1st sort, and 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort at the maximum using polymerase, The partial step for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

(c) The oligonucleotide of the 1st sort elongated by the polymerase reaction which it incubates under existence of ligase and an oligonucleotide adjoins, So that the oligonucleotide of the 2nd sort may be combined and 3' end which has the existing 3' hydroxy function of the oligonucleotide elongated here may adjoin directly 5' end of the oligonucleotide of the 2nd sort which phosphor-izes advantageously and exists, The partial step from which an associated production thing is obtained by it when extension of the oligonucleotide of the 1st sort is performed at a precedence step.

[0054]

The oligonucleotide of the 1st sort and/or the used oligonucleotide of the 2nd sort which were used contain either the base T, A, and C or the base T, A, and G advantageously especially.

[0055]

In the still more advantageous modification mode of this method, the following partial step is carried out after the hybrid on an oligonucleotide array. :

(a) The hybrid of the amplification genomic DNA is carried out to at least one oligonucleotide which has the known arrangement of n nucleotide under formation of a double chain, The partial step by which a hybrid is carried out to the position from which said hybridization oligonucleotide should in part or all be investigated within a genomic DNA probe about methylation of said oligonucleotide at the 3' end of said oligonucleotide.

(b) When the hybrid of the oligonucleotide is beforehand carried out without a base deficit pair to *****-ed at the 3' end of said oligonucleotide, The partial step which is elongated by one nucleotide at least using polymerase, and has a sign which can detect at least one nucleotide and for which said extension depends on the methylation state of each cytosine in a genomic DNA probe.

[0056]

It has a sign advantageously detectable especially for detection of PCR output, extension output, and/or an associated production thing.

[0057]

Preferably, the sign of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is a disengageable mass sign detected with fluorescent labeling, radionuclide, or a mass spectrometer.

[0058]

PCR output, extension output, and/or an associated production thing can detect with a mass spectrometer on the whole preferably, and characterize clearly with the mass of said output by it.

[0059]

In particular, one fragmentation each of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is advantageously detected with a mass spectrometer.

[0060]

The fragmentation of PCR output, extension output, and/or an associated production thing is advantageously generated by digestion by one piece, two or more exonucleases, or endonuclease.

[0061]

The fragmentation generated for the better detectability in a mass spectrometer has net charge positive or negative advantageously especially. [each]

[0062]

PCR output, extension output, and/or an associated production thing are preferably detected and visualized using electronic spray mass spectrometry (ESI), using matrix care laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI-TOF).

[0063]

This method is used for diagnosis of the advantageously disadvantageous result for a patient or an individual, and/or prediction, said disadvantageous result -- following category: -- drugs operation; which is not desirable -- cancer disease; -- CNS malfunction. obstacle or illness; -- aggression syndrome or action obstacle; -- clinical, psychological, and social the conclusion; psychogender obstacle and personality sexual disorder; senile dementia, and/or associative syndrome; cardiovascular disease of a brain disorder. Malfunction and an obstacle; The malfunction of a gastroenteric region, an obstacle, or the malfunction of the illness; respiratory system, An obstacle or the illness; it belongs to at least one of the malfunction of the body as unusual [in an injury, inflammation, infection, immunity, and/or a prognosis; growth process], an obstacle or the illness; skin, muscles, connective tissue or a bony malfunction, an obstacle or illness; internal secretion and metabolic dysfunction, an obstacle, an illness; headache, or the sexual malfunction.

[0064]

This new method is especially used for distinction of a cellular type and an organization or investigation of cell differentiation advantageously.

[0065]

The purpose of this invention is a kit containing the primer for manufacture of the reagent containing a bisulfite, a denaturation reagent or a solvent, the radical scavenger of list 1 statement, and an amplifier, and the guide for implementation of assay.

[0066]

List 1 :

Di-, trihydroxy benzene, a green tea extract (green tea extract), PIKUNOGE Norian (pine bark extract), ginkgo nut 2 leaf extract (EGb761), various fruit extracts and the flavonoid mixture (GNLD) of a vegetable extract, a bio-normalizer (Sun-O), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (NORUJIHIDO log noise rate acid), TOROROKUSU (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman 2-carboxylic acid), 2,6-di-tert-butylphenol, 4-methyl-di-tert-butylphenol, 4-methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vitamin C, vitamin E, the vitamin Q. Hydroquinone, UBIKINON, lignan, a hydroxyterpene, flavonoid, Curcumin, tannin, a retinoic-acid compound, germanium-132 BISUBETA carboxyethyl germanium SESUKIOKISHIDO, Hyperoxidation dismutase (SOD), hyperoxidation catalase, an alpha naphthoflavone, JI (2-methyl-5-chlorophenyl) dithio NETO and Cu(II) derivative, mebendazole, CS (chloroform solubility) alkaloid extract,
4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthoquinone,
4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthoquinone,
4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 1,4-naphthoquinone,
2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthoquinone,

2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthoquinone,
 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 3-bromine 4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,2-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)- Indang 1,3-dione,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy- 3,4-dihydro-2H-naphthalene 1-one,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)- Indang 1-one, 3,3-**- [indene- 1-one [2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-]]-3-yl,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-bromine 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3,5 - jib ****- 4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 2-bromine 3-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro 1,4-anthraquinone,
 3-bromine 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthraquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthraquinone,
 5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1,3-diol,
 3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene 1-oar,
 4-(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4-(3-Krol 5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoate,
 4-(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl)-benzoic acid,
 4-(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl)- Benzoic acid,
 Methyl- 4-(3-hydroxy-1,4-dioxo 1,4-dihydronaphthalene 2-yl-azo)- Benzoate,
 4-(3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl 1,4-dioxo 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracene 2-yl-azo)- Benzoic acid,

3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro cyclopenta[b] naphthalene 1,2-dione,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo cyclohexa 2,5-dienylidene)-5,5,8,8-tetramethyl 5,6,7,8-tetrahydro anthracen-3H-1,2,4-trione,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio- 6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3-bromine 5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl- 1,4-naphthoquinone,
 [0067]

The following example explains this invention.

[0068]

Example :

Implementation of the automated bisulfite reaction.

[0069]

the [of the genomic DNA probe processed in this example according to a manufacturer's directions using control endonuclease] -- application of the detecting method of the methylation state of cytosine in a VIII gene factor is explained. This method is based on use of the automatic-pipet measurement system (MWG RoboSeq4204) which equipped with four independent vertical migration type adaptation the exchangeable pipette measurement tip parts which except cross contamination. This pipette measurement system makes possible pipette measurement of 100microl which has an error below **2microl. The work palette of an automatic-pipet measurement system, Six stands for pipette measurement tip parts, and said 8 pipette-measurement position which can cool two of 8 pipette-measurement positions, The device for separation of a pipette measurement tip part is equipped from the cooling type reagent stand, the lamination system for 10 micro-titration palettes, the pipette measurement tip part surveillance station, and the adapter. The automatic-pipet measurement system is connected with the computer via serial interface.

It is controlled via the software programs which enable free programming of all the pipette measurement steps required for application of this method.

[0070]

At the 1st method step, the aliquot of a DNA probe titrates manually in 96 positions which can have the option to choose a micro titration plate. A micro titration plate follows it and it is Eppendorf. It is heated by 96 °C for the denaturation of a pretreatment DNA probe under use of pattern cycler. Next, a micro titration plate is moved into an automatic-pipet measurement system. In addition to the inside of the denaturation reagent which programmed control was carried out and the aliquot of a denaturation reagent (dioxane) and 3.3 mol of sodium hydronalium GENSARU fight solutions and the aliquot of the radical scavenger solution used from the reagent stand one by one in all the positions containing DNA, pipette measurement is carried out. It is followed and a micro titration plate is Eppendorf. It incubates until all the non-methylating cytosine residue is converted by the bisulfite addition under an operation of a sodium hydronalium GENSARU fight into a DNA probe within pattern cycler.

[0071]

A micro titration plate is moved from a thermocycler into an automatic-pipet measurement system after bisulfite processing. The 2nd micro titration plate of the same form is prefaced. In all the chambers which contain a bisulfite processing DNA probe in a position equivalent to the 1st micro titration plate top of a chamber, An introduction basicity tris-HCl buffer (pH 9.5) is moved, and the aliquot of heavy bad second acid chloride processing DNA is moved to the position to which the 2nd micro titration plate corresponds following it. The heavy bad second acid chloride addition of non-methylating cytosine residue is converted into uracil residue within a basic solution.

[0072]

Polymerase chain reaction (PCR) performed amplification made into the target of the chain (this example sense strand) of bisulfite processing DNA. The 1 type (AGG GAG TTT TTT TTA GGG AAT AGA GGG A (SEQ-ID:1) and TAA TCC CAA AAC CTC TCC ACT ACA ACA A (SEQ-ID:2)) primer pair is used, Although this enables specific amplification of the bisulfite processing DNA strand which stored a success, specific amplification of said DNA strand which the non-methylating cytosine residue of the DNA strand was not converted into uracil residue, or was converted imperfectly is not enabled. For an PCR reaction, the 3rd micro titration plate of the same form is prefaced with an automatic-pipet measurement system. Within all the chambers which contain a bisulfite processing DNA probe in a position equivalent to the 1st micro titration plate top of a chamber, pipette measurement of the aliquot of the undiluted solution which contains an PCR buffer, DNA polymerase, and the 1 type primer first is carried out automatically. Then, before the aliquot of bisulfite processing DNA automatically diluted from each position of the 2nd micro titration plate is moved into cycler for implementation of said aliquot of an PCR reaction, it is moved to the position of the 3rd micro titration plate. PCR output is identified by agarose gel electrophoresis and coloring according to an ethidium bromide following it (drawing 1). Drawing 1 is the gel figure in which the bisulfite processing DNA strand carried out PCR amplification (left figure: a molecular weight marker, right:PCR output).

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]

Drawing 1 is the gel figure in which the bisulfite processing DNA strand carried out PCR amplification.

DRAWINGS

[Drawing 1]



(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500892

(P2004-500892A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl.⁷

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

Z N A A

2 G O 4 5

C 1 2 N 15/09

G O 1 N 27/62

V

4 B O 6 3

G O 1 N 27/62

G O 1 N 33/53

M

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/58

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-504676 (P2002-504676)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月19日 (2001.6.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月13日 (2002.12.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2001/002274
 (87) 国際公開番号 W02001/098528
 (87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001.12.27)
 (31) 優先権主張番号 100 29 915.6
 (32) 優先日 平成12年6月19日 (2000.6.19)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 500247105
 エピゲノミクス アーゲー
 ドイツ国、デー-10435 ベルリン、
 カスタニーンアレー 24
 (74) 代理人 100093735
 弁理士 荒井 鐘司
 (74) 代理人 100105429
 弁理士 河野 尚孝
 (74) 代理人 100108143
 弁理士 嶋崎 英一郎
 (72) 発明者 ベルリン、クルト
 ドイツ国、14532 スターンスドルフ
 、マリエンケーフェルヴェーク 4
 Fターム(参考) 2G045 CB01 DA13 FB02 FB07 FB08
 FB12 GC15 GC30
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シトシン-メチル化の検出方法

(57) 【要約】

本発明は、DNA内のシトシンメチル化の検出方法に関する。

【解決手段】 DNA内のシトシン-メチル化の検出方法であって、

- a) ゲノムDNAプローブが濃度範囲0.1 mol/l及び6 mol/lの間で重亜硫酸塩 (= 亜硫酸水素、二亜硫酸化物) の溶液でインキュベートされるものにおいて、変性試薬及び/又は溶剤ならびに少なくとも1種の遊離基捕捉剤が存在する作業ステップと、
- b) 処理DNAプローブが水又は水溶液で希釈される作業ステップと、
- c) DNAプローブがポリメラーゼ反応で増幅される作業ステップと、
- d) ステップa) による処理によって配列がゲノムDNAプローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、かつゲノムDNAプローブ内の少なくとも1個の座のメチル化状態を推論する作業ステップと、が実施される方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA内のシトシンーメチル化の検出方法であって、

a) ゲノムDNAプローブが濃度範囲0.1mol/l及び6mol/lの間で重亜硫酸塩(=亜硫酸水素、二亜硫化物)の溶液でインキュベートされるものにおいて、変性試薬及び/又は溶剤ならびに少なくとも1種の遊離基捕捉剤が存在する作業ステップと、

b) 処理DNAプローブが水又は水溶液で希釈される作業ステップと、

c) DNAプローブがポリメラーゼ反応で増幅される作業ステップと、

d) ステップa)による処理によって配列がゲノムDNAプローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、かつゲノムDNAプローブ内の少なくとも1個の座のメチル化状態を推論する作業ステップと、が実施されることを特徴とする方法。 10

【請求項2】

変性試薬及び/又は溶剤が次の化合物群又は化合物類の目録から選択されることを特徴とする、請求項1記載の方法：

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及び置換誘導体、尿素又は誘導体、アセトニトリル、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO、THF。

【請求項3】

遊離基捕捉剤が次の化合物群から選択されることを特徴とする、請求項1又は2記載の方法：

ジー、トリヒドロキシベンゼン、緑茶エキス(green tea extract)、ピクノゲノール(pine bark extract)、銀杏二葉エキス(EGb761)、種々の果実エキス及び野菜エキスのフラボノイド混合物(GNLD)、バイオノーマライザ(Sun-O社)、DPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)、NDGA(ノルジヒドログアヤレート酸)、トロロクス(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸)、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、4-メチル-ジ-tert-ブチルフェノール、4-メトキシ-ジ-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール、3,4-ジヒドロキシ安息香酸、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンQ、ヒドロキノン、ユビキノ、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミン、タンニン、レチン酸化合物、Ge-132ビスベータカルボキシエチル-ゲルマニウム-セスキオキシド、過酸化ジスルファート(SOD)、過酸化カタラーゼ、アルファ-ナフトフラボン、ジ(2-メチル-5-クロロフェニル)ジチオネート及びCu(II)誘導体、メベンダゾール、CS(クロロホルム溶解性)アルカロイド-エキス、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1,2-ナフトキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,2-ナフトキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-1,2-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ブロム-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-クロル-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノ、

- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4 - ナフトキノ
ン、
- 4 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
、 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アントラキノ
ン、
- 4 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アントラキノ
ン、
- 4 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テ
トラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アントラキノ
ン、
- 3 - プロム - 4 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 10
、 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン
) - インダン - 1 , 3 - ジオン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン
) - 3 , 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフ
タリン - 1 - オン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン
) - 3 , 4 - エポキシ - 3 , 4 - ジメトキシ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1
- オン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン 20
、
- 3 , 3 - ビー [2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - イン
デン - 1 - オン] - 3 - イル、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロム - 5 , 5
、 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロール - 5 , 5
、 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 30
、 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テ
トラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - プロム - 3 - (3 - プロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5
、 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - プロム - 3 - (3 , 5 - ジプロム - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テ
トラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノ
ン、
- 2 - プロム - 3 - (3 - プロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 40
- ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4
- アントラキノ
ン、
- 3 - プロム - 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4
- アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1 ,
4 - アントラキノ
ン、
- 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1
、 4 - アントラキノ
ン、
- 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 , 3 - ジ
オール、

3-メトキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタリン-1-オール、
 4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、
 メチル-4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸塩、
 4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)-安息香酸、
 メチル-(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)-安息香酸、
 4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、
 メチル-4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル-アゾ)-安息香酸塩、
 4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル-アゾ)-安息香酸、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン)-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロシクロペンタ[b]ナフタリン-1, 2-ジオン、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン)-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロアントラセン-3H-1, 2, 4-トリオン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5, 8-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-6, 7-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-5-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-6-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-6-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5, 6-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-5, 6-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5, 7-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-5, 7-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-エチルチオ-5-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-エチルチオ-6-メチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-5, 8-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-6, 7-ジメチル-1, 4-ナフトキノン、

10

20

30

40

50

2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 - ブロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ
 - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン。

10

【請求項 4】

ゲノム DNA プローブが処理前に熱的に変性されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項記載の方法。 20

【請求項 5】

ステップ c) が

a) 請求項 1 による前処理 DNA プローブに非特異的にハイブリッドし、そこから PCR
 ステップで 1 個以上の増幅体が生じる様々な配列の少なくとも 1 個のプライマー対による
 PCR 前増幅の部分ステップと、
 b) それぞれ請求項 1 による前処理 DNA プローブ [(+) 鎖又は (-) 鎖] の一部分と
 同じか又は相補的であり、被増幅 DNA に特異的にハイブリッドする様々な配列のプライ
 マーによる前増幅で形成された生成物の PCR 増幅の部分ステップと、で実施されること
 を特徴とする、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 6】

複数個の DNA 部分の増幅が反応容器内で実施されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

ポリメラーゼ反応のために耐熱性 DNA ポリメラーゼが使用されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 のステップ c) の前に DNA の脱スルホン化が実施されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

40

前処理 DNA の検出のために PCR 生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き

a) 増幅ゲノム DNA が二重鎖の形成下に少なくとも 1 個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で直接的に又は 10 塩基までの間隔で前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノム DNA プローブ内で調査されるべき位置に隣接する部分ステップと、

(b) n ヌクレオチドの既知の配列を有するオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド 1 個分だけ伸長され、このヌクレオチドが検出可能の標識を有し、前記伸長がゲノム DNA プローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップと、が実施されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項記載の方 50

法。

【請求項 10】

前処理 DNA の検出のために PCR 生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き

a) オリゴヌクレオチドの 1 セットが二重鎖の形成下に増幅ゲノム DNA にハイブリッドされ、このオリゴヌクレオチドのセットが 2 種類の種からなり、かつ第 1 種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で直接的に又は 10 塩基までの間隔でゲノム DNA プローブ内の前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関して調査されるべき位置に隣接し、かつ第 2 種の第 2 オリゴヌクレオチドが標的分子の第 2 領域にハイブリッドされ、その結果第 2 種のオリゴヌクレオチドの 5' 末端が個々のヌクレオチドの大きさ又は 10 ヌクレオチドまでの隙間によって前記選択位置の箇所で第 1 種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドの 3' 末端から分離されている部分ステップと、

10

(b) n ヌクレオチドの既知の配列を有する第 1 種のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して最大でも第 1 種のオリゴヌクレオチドの 3' 末端と第 2 種のオリゴヌクレオチドの 5' 末端との間にあるヌクレオチドの個数分だけ伸長され、前記伸長がゲノム DNA プローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップと、

(c) オリゴヌクレオチドがリガーゼの存在下にインキュベートされ、隣接するポリメラーゼ反応によって伸長された第 1 種のオリゴヌクレオチドと、第 2 種のオリゴヌクレオチドとが結合され、ここで伸長されたオリゴヌクレオチドの既存の 3' ヒドロキシ機能を有する 3' 末端が直接第 2 種のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に隣接するように、先行ステップで第 1 種のオリゴヌクレオチドの伸長が行われた場合、それによって連結生成物が得られる部分ステップと、が実施されることを特徴とする、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 11】

使用した第 1 種のオリゴヌクレオチド及び／又は使用した第 2 種のオリゴヌクレオチドが塩基 T、A 及び C のみ又は塩基 T、A 及び G のいずれかを含有することを特徴とする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前処理 DNA の検出のために PCR 生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き

30

(a) 増幅ゲノム DNA が二重鎖の形成下に n ヌクレオチドの既知の配列を有する少なくとも 1 個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で一部又は全部前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノム DNA プローブ内で調査されるべき位置にハイブリッドされる部分ステップと、

(b) オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端であらかじめ塩基欠損対なしに被検位置にハイブリッドされる場合に、ポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド 1 個分だけ伸長され、少なくとも 1 個のヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノム DNA プローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップと、が実施されることを特徴とする、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 13】

PCR 生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が検出のために検出可能な標識を有することを特徴とする、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

標識が蛍光標識であることを特徴とする、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

標識が放射性核種であることを特徴とする、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

50

ヌクレオチドの標識が、質量分析計で検出可能である分離可能の質量標識であることを特徴とする、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

P C R 生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が全体で質量分析計で検出され、それによって前記生成物の質量により明確に特徴づけられることを特徴とする、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 18】

P C R 生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物の各 1 個のフラグメントが質量分析計で検出されることを特徴とする、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 19】

P C R 生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物のフラグメントが 1 個又は複数のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる消化によって生成されることを特徴とする、請求項 18 記載の方法。

10

【請求項 20】

質量分析計でのより良い検出性のために生成されたフラグメントが個々の正又は負の実効電荷を有することを特徴とする、請求項 18 及び 19 記載の方法。

【請求項 21】

P C R 生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物がマトリックス助レーザー脱着／イオン化質量分析法 (M A L D I - T O F) を利用して、又は電子スプレー質量分析法 (E S I) を利用して検出され、かつ可視化されることを特徴とする、上記請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 22】

ゲノム D N A が D N A プローブから得られ、D N A の由来源が、例えば細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン植込み組織、例えば眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房又は肝臓の組織、組織スライド及びそれら全ての可能な組合せを包含する、上記請求項 1 ないし 21 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 23】

患者又は個体にとり不利な結果の診断及び／又は予測のための上記請求項 1 ないし 22 のいずれか 1 項記載の方法の使用において、前記不利な結果が次のカテゴリ：望ましくない薬剤作用；癌罹患；C N S 機能不全、障害又は疾病；攻撃性症候群又は挙動障害；脳障害の臨床的、心理学的及び社会的な帰結；精神性障害及び人格性障害；老年痴呆及び／又は連想症候群；心臓血管病、機能不全及び障害；胃腸域の機能不全、障害又は疾病；呼吸系の機能不全、障害又は疾病；負傷、炎症、感染、免疫及び／又は予後；発育過程中的の異常としての身体の機能不全、障害又は疾病；皮膚、筋肉、結合組織又は骨の機能不全、障害又は疾病；内分泌及び代謝機能不全、障害又は疾病；頭痛又は性的機能不全の少なくとも 1 つに属している方法の使用。

30

【請求項 24】

細胞型又は組織の区別又は細胞差異化の調査のための上記請求項 1 ないし 23 のいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 25】

重亜硫酸塩を含有する試薬と、変性試薬又は溶剤と、増幅体の製造のための遊離基捕捉剤及びプライマーと、請求項 1 ないし 22 のいずれか 1 項記載のアッセイの実施のための手引書とからなるキット。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、D N A 内のシトシンメチル化の検出方法に関する。

【0002】

近年の方法論的開発により分子生物学においてよく研究されている観察レベルは、遺伝子自体と、この遺伝子の R N A への翻訳と、そこから生ずるタンパク質である。個体の発現の経過の中でいつ、どの遺伝子がスイッチを入れられ、特定の細胞及び組織内の特定の遺

50

伝子の活性及び阻害がどのように制御されるかは、遺伝子もしくはゲノムのメチル化の規模と特性によって相関関係をつけることができる。その限りにおいて、病源体の状態が個々の遺伝子又はゲノムの変化したメチル化パターンに現れる。

【 0 0 0 3 】

5-メチルシトシンは、真核細胞のDNA内で最も頻繁に共有結合で修飾される塩基である。この塩基は、例えば転写の調節、遺伝子刷込み及び腫瘍形成においてある役割を果たしている。従って、遺伝子情報の構成要素としての5-メチルシトシンの同定が非常に重要である。ところが、5-メチルシトシン位置は、5-メチルシトシンがシトシンと同じ塩基対挙動を有するため、配列決定によって同定することができない。さらに、PCR増幅において5-メチルシトシンを有する後成情報が完全に失われてしまう。

10

【 0 0 0 4 】

比較的新規の、この間に頻繁に適用されている5-メチルシトシン上のDNAの調査方法は、シトシンと重亜硫酸塩の特異的反応に基づき、それに続くアルカリ性加水分解によって、ウラシルの塩基対挙動でチミジンに相当するウラシルに転換される。それに対し、5-メチルシトシンは前記条件下に修飾されない。それにより原初のDNAは、原初にそのハイブリッド形成挙動によってシトシンから区別できないメチルシトシンが、今や「常法の」分子生物学の技術によって唯一残留するシトシンとして、例えば増幅及びハイブリッド形成又は配列決定によって検出できるように転換される。これらの技術は全て現在全面的に利用される塩基対に基づく。感受性に関する先行技術は、被検DNAをアガロース・マトリックス内に封じ込める方法によって定義され、それによりDNAの拡散及び復元（重亜硫酸塩は一本鎖DNAにのみ反応する）を妨害し、全ての沈降ステップ及び洗浄ステップが迅速な透析に置換される（Olek, A.ら、Nucleic Acids Res. 1996, 24, 5064-5066）。この方法によって個々の細胞を調査することができ、この方法の可能性が具体的に説明されている。確かに、従来個々の領域のみが約3000塩基対長まで調査されているが、可能なメチル化解析の数千にわたる細胞の全体的な調査は不可能である。しかし、この方法も少ないサンプル量からなる非常に小さいフラグメントを確実に解析することができない。これはマトリックスによる拡散防止にも関わらず失われる。

20

【 0 0 0 5 】

5-メチルシトシンを検出する別の公知の可能性に関する概要は、次の概要論文から読み取ることができる：Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255。

30

【 0 0 0 6 】

重亜硫酸塩技術は、従来幾つかの例外（例えばZechnick, M.ら、Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98）を除き研究の中でのみ使用されている。しかし、常に既知の遺伝子の短い特異的部分を重亜硫酸塩処理によって増幅し、完全に配列決定（Olek, A.及びWalter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276）するか、又は個々のシトシン位置を「プライマー伸長反応」（Primer-Extension-Reaktion）（Gonzalgo, M. L.及びJones, P. A., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669）によって、又は酵素切断（Xiong, Z.及びLaird, P. W., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2532-2534）によって検出されている。特に、ハイブリッド形成による検出も記載されている（Olekら、WO 9928498）。

40

【 0 0 0 7 】

個々の遺伝子におけるメチル化検出のための重亜硫酸塩技術の適用を取り上げているその他の出版物は次のとおりである：Xiong, Z.及びLaird, P. W. (1997), Nucleic Acids Res. 25, 2532; Gonzal 50

go, M. L. 及び Jones, P. A. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2529; Grigg, S. 及び Clark, S. (1994), *Bioassays* 16, 431; Zeschnek, M. ら (1997), *Human Molecular Genetics* 6, 387; Teil, R. ら (1994), *Nucl. Acids Res.* 22, 695; Martin, V. ら (1995), *Gene* 157, 261; WO 9746705、WO 9515373 及び WO 45560.

【0008】

オリゴマー配列の製造における先行技術に関する展望は、1999年1月に発行された自然発生学特別号 (*Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999*) から、そこで引用されている文献及び低減された非特異的バックグラウンド信号によるオリゴヌクレオチドのような標的分子のための固体担体の製造方法に関する米国特許第5994065号から読み取ることができる。

【0009】

不動態DNA配列の走査のために、多くは蛍光標識プローブが使用されている。蛍光標識に特に好適なのは、各プローブの5' OHにCy3及びCy5色素の簡単な取り込みである。ハイブリッドプローブの蛍光の検出は、例えば共焦点顕微鏡を介して行われる。色素Cy3及びCy5は、その他の多くの色素と並んで商業的に入手することができる。

【0010】

マトリックス介助レーザー脱着/イオン化質量分析法 (MALDI-TOF) は、生体分子を解析するための非常に高性能の開発である (Karas, M. 及び Hillenkamp, F. (1988), *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem.* 60: 2299-2301)。解析体が吸光マトリックス内へ埋め込まれる。短レーザーパルスによってマトリックスが蒸発され、解析体分子がこのようにフラグメント化されずに気相中へ輸送される。マトリックス分子との衝突によって、解析体のイオン化が達成される。印加した電圧が無磁界の飛行管内へイオンを加速する。前記イオンの質量が異なるために、イオンが様々な強さで加速される。より小さいイオンは、より大きいイオンよりも速く検出器に到達する。

【0011】

MALDI-TOF分光法は、ペプチド類とタンパク質類の解析に非常に良く適している。核酸の解析は多少困難である (Gut, I. G. 及び Beck, S. (1995), *DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends* 1: 147-157)。核酸の場合は、感受性がペプチドよりも約100倍悪くなり、フラグメントサイズの増加とともに過度に減少する。多量に負に帯電したバックボーンを有する核酸の場合、マトリックスによるイオン化プロセスは本質的に非効率的である。MALDI-TOF分光法の場合、マトリックスの選択が顕著に重要な役割を果たす。ペプチド類の脱着については、非常に微細な結晶化を生じる幾つかの非常に高性能のマトリックス類が見い出されている。DNAの場合は、確かにこの間に幾つかの興味をひくマトリックス類が存在するが、それによって感受性の差異は縮小されなかった。この感受性の差異は、DNAがペプチドに類似するように、前記DNAが化学的に修飾されることによって縮小させることができる。通常のバックボーンのリン酸塩がチオリン酸塩と置換されたホスホロチオエート核酸は、簡単なアルキル置換化学によって中性電荷のDNAに転換することができる (Gut, I. G. 及び Beck, S. (1995), *A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res.* 23: 1367-1373)。

この修飾DNAへの「電荷標識」(charge tags)のカップリングは、総量がペプチドの場合で見いだされるものと同じ量分の感受性の向上で生じる。charge tagging のもう1つの長所は、非修飾基質の検出を非常に困難にする不純物に対する解析の安定性が向上することである。

【0012】

ゲノムDNAは、細胞-、組織-又はその他の実験プローブのDNAから標準方法で得られる。この標準方法は、「フリッチ及びマニアティス編、分子クローニング：実験マニュアル、1989年」(Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989)のような参考文献に見いだされる。

10

【0013】

尿素は、ゲノムDNA内の5-メチルシトシンの配列決定前の重亜硫酸塩処理の効率を改善する(Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA, (1998), Nucleic Acids Res. 26: 5009-5010)。

【0014】

従って、本発明の課題は、先行技術の欠点を克服するDNA内のシトシン-メチル化の検出方法を提供することである。

【0015】

この課題は、DNA内のシトシン-メチル化の検出方法が提供されるものにおいて、次の作業ステップが実施されることによって解決される： 20

a) ゲノムDNAプローブが濃度範囲0.1mol/l及び6mol/lの間で重亜硫酸塩(=亜硫酸水素、二亜硫酸物)の溶液でインキュベートされるものにおいて、変性試薬及び/又は溶剤ならびに少なくとも1種の遊離基捕捉剤が存在する作業ステップ。

b) 処理DNAプローブが水又は水溶液で希釈される作業ステップ。

c) DNAプローブがポリメラーゼ反応で増幅される作業ステップ。

d) ステップa)による処理によって配列がゲノムDNAプローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、かつゲノムDNAプローブ内の少なくとも1個の座のメチル化状態を推論する作業ステップ。

【0016】

本発明にしたがって、この場合に変性試薬及び/又は溶剤が次の化合物群又は化合物類の目録から選択されていることが有利である： 30

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキササン及び置換誘導体、尿素又は誘導体、アセトニトリル、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO、THF。

【0017】

さらに、この場合に遊離基捕捉剤が次の化合物群から選択されていることが有利である：

ジー、トリヒドロキシベンゼン、緑茶エキス(green tea extract)、 40
 ピクノゲノール(pine bark extract)、銀杏二葉エキス(EGb761)、種々の果実エキス及び野菜エキスのフラボノイド混合物(GNLD)、バイオノーマライザ(Sun-O社)、DPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)、NDGA(ノルジヒドログアヤレート酸)、トロロクス(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸)、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、4-メチル-ジ-tert-ブチルフェノール、4-メトキシ-ジ-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール、3,4-ジヒドロキシ安息香酸、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンQ、ヒドロキノン、ウビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミン、タンニン、レチン酸化合物、Ge-132ビスベータカルボキシエチル-ゲルマニウム-セスキオキシド、過酸化ジスムタ 50

ーゼ (SOD)、過酸化カタラーゼ、アルファーナフトフラボン、ジ (2-メチル-5-クロロフェニル) ジチオネート及びCu (II) 誘導体、メベンダゾール、CS (クロロホルム溶解性) アルカロイド-エキス、

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ヒドロキシ-1, 2-ナフトキノン、

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-メトキシ-1, 2-ナフトキノン、

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -1, 2-ナフトキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ブロム-1, 4-ナフトキノン、 10

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-クロル-1, 4-ナフトキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-メトキシ-1, 4-ナフトキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -1, 4-ナフトキノン、

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 2-アントラキノン 20

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-メトキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 2-アントラキノン、

4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 2-アントラキノン、

3-ブロム-4- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 2-アントラキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン) -インダン-1, 3-ジオン、 30

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン) -3, 4-エポキシ-3-ヒドロキシ-4-メトキシ-3, 4-ジヒドロ-2H-ナフタリン-1-オン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン) -3, 4-エポキシ-3, 4-ジメトキシ-3, 4-ジヒドロ-2H-ナフタリン-1-オン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -インダン-1-オン、3, 3-ビス [2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -インデン-1-オン] -3-イル、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ブロム-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノン、 40

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-メトキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノン、

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル) -5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノン、 50

2-ブロム-3-(3-ブロム-5-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ
ン、

2-ブロム-3-(3, 5-ジブロム-4-ヒドロキシフェニル)-5, 5, 8, 8-テ
トラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ
ン、

2-ブロム-3-(3-ブロム-5-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3
-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4
-アントラキノ
ン、

3-ブロム-2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-1, 4
-アントラキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,
4-アントラキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1
,
4-アントラキノ
ン、

5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタリン-1, 3-ジ
オール、

3-メトキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタリ
ン-1-オール、

4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6
,
7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、

メチル-4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4
,
5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸塩、

4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)-
安息香酸、

メチル-(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)
-安息香酸、

4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5
,
6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、

メチル-4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-
イル-アゾ)-安息香酸塩、

4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5
,
6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル-アゾ)-安息香酸、

3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサー-2, 5-ジエニリデン
)
-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロシクロペンタ [b]
ナフタリン-1, 2-ジオン、

3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサー-2, 5-ジエニリデン
)
-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロアントラセン-3H
-1, 2, 4-トリオン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5,
8-ジメチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-6,
7-ジメチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5-
メチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-5-
メチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-6-
メチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-メトキシ-6-
メチル-1, 4-ナフトキノ
ン、

10

20

30

40

50

2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 8 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 - ブロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ
 - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、

10

20

30

【 0 0 1 8 】

本発明にしたがって、この場合にゲノムDNAプローブが処理前に熱的に変性されることが有利である。

【 0 0 1 9 】

特に、本発明にしたがって、ステップc)が、

a) 請求項1による前処理DNAプローブに非特異的にハイブリッドし、そこからPCR
ステップで1個以上の増幅体が生じる様々な配列の少なくとも1個のプライマー対による
PCR前増幅の部分ステップと、

b) それぞれ請求項1による前処理DNAプローブ〔(+)鎖又は(-)鎖〕の一部分と
同じか又は逆相補的であり、被増幅DNAに特異的にハイブリッドする様々な配列のプライ
マーによる前増幅で形成された生成物のPCR増幅の部分ステップとで実施されることが
有利である。

【 0 0 2 0 】

さらに、本発明にしたがって、複数個のDNA部分の増幅が反応容器内で実施されることが
有利である。

【 0 0 2 1 】

50

さらに、本発明にしたがって、ポリメラーゼ反応のために耐熱性DNAポリメラーゼが使用されることが有利である。

【 0 0 2 2 】

特に、本発明にしたがって、本発明による方法のステップc)の前にDNAの脱スルホン化が実施されることが有利である。

【 0 0 2 3 】

また、前処理DNAの検出のためにPCR生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である：

【 0 0 2 4 】

a) 増幅ゲノムDNAが二重鎖の形成下に少なくとも1個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で直接的に又は10塩基までの間隔で前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムDNAプローブ内で調査されるべき位置に隣接する部分ステップ。 10

(b) nヌクレオチドの既知の配列を有するオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、このヌクレオチドが検出可能の標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【 0 0 2 5 】

本発明にしたがって、前処理DNAの検出のためにPCR生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である： 20

a) オリゴヌクレオチドの1セットが二重鎖の形成下に増幅ゲノムDNAにハイブリッドされ、このオリゴヌクレオチドのセットが2種類の種からなり、かつ第1種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で直接的に又は10塩基までの間隔でゲノムDNAプローブ内の前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関して調査されるべき位置に隣接し、かつ第2種の第2オリゴヌクレオチドが標的分子の第2領域にハイブリッドされ、その結果第2種のオリゴヌクレオチドの5'末端が個々のヌクレオチドの大きさ又は10ヌクレオチドまでの隙間によって前記選択位置の箇所第1種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドの3'末端から分離されている部分ステップ。

(b) nヌクレオチドの既知の配列を有する第1種のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して最大でも第1種のオリゴヌクレオチドの3'末端と第2種のオリゴヌクレオチドの5'末端との間にあるヌクレオチドの個数分だけ伸長され、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。 30

(c) オリゴヌクレオチドがリガーゼの存在下にインキュベートされ、隣接するポリメラーゼ反応によって伸長された第1種のオリゴヌクレオチドと、第2種のオリゴヌクレオチドとが結合され、それによって、ここで伸長されたオリゴヌクレオチドの既存の3'ヒドロキシ機能を有する3'末端が直接第2種のオリゴヌクレオチドの5'末端に隣接するように、先行ステップで第1種のオリゴヌクレオチドの伸長が行われた場合に連結生成物が得られる部分ステップ。

【 0 0 2 6 】

この場合、本発明にしたがって、使用した第1種のオリゴヌクレオチド及び／又は使用した第2種のオリゴヌクレオチドが塩基T、A及びCのみ又は塩基T、A及びGのいずれかを含有することが特に有利である。 40

【 0 0 2 7 】

さらに、本発明にしたがって、前処理DNAの検出のためにPCR生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である：

(a) 増幅ゲノムDNAが二重鎖の形成下にnヌクレオチドの既知の配列を有する少なくとも1個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で一部又は全部前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムDNAプローブ内で調査されるべき位置にハイブリッドされる部分ス 50

テップ。

(b) オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの3'末端であらかじめ塩基欠損対なしに被検位置にハイブリッドされる場合に、ポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、少なくとも1個のヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【0028】

また、本発明にしたがって、PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が検出のために検出可能な標識を有することも有利である。この場合、標識が蛍光標識であり及び／又は標識が放射性核種であることが特に有利である。この場合、ヌクレオチドの標識が、質量分析計で検出可能である分離可能な質量標識であることが特に有利である。 10

【0029】

特に、PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が全体で質量分析計で検出され、それによって前記生成物の質量により明確に特徴づけられることも有利である。本発明にしたがって、PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物の各1個のフラグメントが質量分析計で検出されることも有利である。

【0030】

本発明による方法は、PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物のフラグメントが1個又は複数個のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる消化によって生成されることを特徴とすることも有利である。 20

【0031】

さらに、質量分析計でのより良い検出性のために生成されたフラグメントが個々の正又は負の実効電荷を有することが有利である。

【0032】

PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物がマトリックス助レーザー脱着／イオン化質量分析法(MALDI-TOF)を利用して、又は電子スプレー質量分析法(ESI)を利用して検出され、かつ可視化されることが申し分なく特に有利である。

【0033】

本発明による方法は、ゲノムDNAがDNAプローブから得られ、DNAの由来源が、例えば細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン植込み組織、例えば眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房又は肝臓の組織、組織スライド及びそれら全ての可能な組合せを包含することも有利である。 30

【0034】

本発明のもう1個の目的は、患者又は個体にとり不利な結果の診断及び／又は予測のための本発明による方法の使用において、前記不利な結果が次のカテゴリ：望ましくない薬剤作用；癌罹患；CNS機能不全、障害又は疾病；攻撃性症候群又は挙動障害；脳障害の臨床的、心理学的及び社会的な帰結；精神性障害及び人格性障害；老年痴呆及び／又は連想症候群；心臓血管病、機能不全及び障害；胃腸域の機能不全、障害又は疾病；呼吸系の機能不全、障害又は疾病；負傷、炎症、感染、免疫及び／又は予後；発育過程中的の異常としての身体の機能不全、障害又は疾病；皮膚、筋肉、結合組織又は骨の機能不全、障害又は疾病；内分泌及び代謝機能不全、障害又は疾病；頭痛又は性的機能不全の少なくとも1つに属している方法の使用である。 40

【0035】

また、本発明の目的は、細胞型又は組織の区別又は細胞差異化の調査のための本発明による方法の使用である。

【0036】

最後に、本発明のもう1つの目的は、重亜硫酸塩を含有する試薬と、変性試薬又は溶剤と、増幅体の製造のための遊離基捕捉剤及びプライマーと、本発明による方法によるアッセイの実施のための手引書とからなるキットである。

【0037】

本発明は、ピペット測定ステップのみを含むメチルシトシンの自動化可能の検出方法を提供することによって、既存の方法の効率が処理の簡便性、品質、コスト及び特にスループットに関して改善される。

【 0 0 3 8 】

ゲノム DNA プローブ内のメチルシトシンの自動化可能の検出方法を記載する。

【 0 0 3 9 】

被解析ゲノム DNA は、有利にはゲノム DNA が DNA の常法の由来源、例えば細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン植込み組織、例えば眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房又は肝臓の組織、組織スライド及びそれら全ての可能な組合せから得られる。

10

【 0 0 4 0 】

この方法の第 1 ステップで、使用した DNA が有利には重亜硫酸塩 (= 二亜流化物、亜硫酸水素) により、塩基対挙動に関して様々な塩基が発生し、他方、5 位メチル化シトシンが変化しないで残るように、塩基の 5 位にメチル化しない全てのシトシンが変化されるように処理される。

【 0 0 4 1 】

ゲノム DNA プローブは、特に有利には処理前に熱的に変性される。

【 0 0 4 2 】

反応のために濃度範囲 0.1 mol/l 及び 6 mol/l の間で重亜硫酸塩が使用される場合、非メチル化シトシン塩基に付加が行われる。本発明による方法の場合は、特に変性試薬又は溶剤ならびに遊離基捕捉剤が存在しなければならない。

20

【 0 0 4 3 】

この場合、変性試薬又は溶剤として有利には次の化合物群又は化合物類が対象となる。

【 0 0 4 4 】

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及び置換誘導体、尿素又は誘導体、アセトニトリル、第 1 級アルコール、第 2 級アルコール、第 3 級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO 又は THF。

【 0 0 4 5 】

遊離基捕捉剤として、目録 1 に列挙した化合物群又はその誘導体群が好ましく適している。それに続きアルカリ性加水分解が次にウラシル内の非メチル化シトシン-ヌクレオベースの転換を生ぜしめる。

30

【 0 0 4 6 】

第 2 方法ステップで、処理 DNA プローブが水又は水溶液で希釈される。有利には、それに続きアルカリ性 pH 値で DNA の脱スルホン化 (10 - 30 分、90 - 100 °C) が実施される。

【 0 0 4 7 】

この方法の第 3 ステップで、DNA プローブがポリメラーゼ連鎖反応、有利には耐熱性 DNA ポリメラーゼで増幅される。複数個の DNA 部分の増幅は、好ましくは反応容器の中で行われる。

40

【 0 0 4 8 】

この方法ステップは、好ましくは 2 部分ステップで実施される。これは前処理 DNA プローブを非特異的にハイブリッドし、そこから PCR ステップで 1 個以上の増幅体を得る様々な塩基配列の少なくとも 1 個のプライマー対を用いる PCR 前増幅によって開始される。その後、前増幅で形成された生成物の PCR 増幅が様々な塩基配列のプライマーによって実施され、これがそれぞれ前処理 DNA プローブ [(+) 鎖又は (-) 鎖] の部分と同じか又は逆相補的であり、被増幅 DNA を特異的にハイブリッドする。

【 0 0 4 9 】

この場合、前記のような前増幅がしばしば PCR 反応としてではなく、耐熱性ポリメラー

50

ぜを必要としないプライマー伸長反応として実施されることは明確である。

【 0 0 5 0 】

最後の方法ステップで、配列が重亜硫酸塩を含有する試薬による処理によってゲノム DNA プローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、ゲノム DNA プローブ内の少なくとも 1 個の座のメチル化状態が推論される。

【 0 0 5 1 】

検出のために PCR 生成物が特に有利にはオリゴヌクレオチド配列上にハイブリッドされる。

【 0 0 5 2 】

この方法の有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上のハイブリッド後に次の 10
部分ステップが実施される：

a) 増幅ゲノム DNA が二重鎖の形成下に少なくとも 1 個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で直接的に又は 10 塩基までの間隔で前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノム DNA プローブ内で調査されるべき位置に隣接する部分ステップ。

(b) n ヌクレオチドの既知の配列を有するオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド 1 個分だけ伸長され、このヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノム DNA プローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【 0 0 5 3 】

この方法のもう 1 つの有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上にハイブリッド後に次の部分ステップが実施される：

a) オリゴヌクレオチドの 1 セットが二重鎖の形成下に増幅ゲノム DNA にハイブリッドされ、このオリゴヌクレオチドのセットが 2 種類の種からなり、かつ第 1 種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で直接的に又は 10 塩基までの間隔でゲノム DNA プローブ内の前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関して調査されるべき位置に隣接し、かつ第 2 種の第 2 オリゴヌクレオチドが標的分子の第 2 領域にハイブリッドされ、その結果第 2 種のオリゴヌクレオチドの 5' 末端が個々のヌクレオチドの大きさ又は 10 ヌクレオチドまでの隙間によって前記選択位置の箇所で第 1 種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドの 3' 末端から分離されている部分ステップ。 30

(b) n ヌクレオチドの既知の配列を有する第 1 種のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して最大でも第 1 種のオリゴヌクレオチドの 3' 末端と第 2 種のオリゴヌクレオチドの 5' 末端との間にあるヌクレオチドの個数分だけ伸長され、前記伸長がゲノム DNA プローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

(c) オリゴヌクレオチドがリガーゼの存在下にインキュベートされ、隣接するポリメラーゼ反応によって伸長された第 1 種のオリゴヌクレオチドと、第 2 種のオリゴヌクレオチドとが結合され、ここで伸長されたオリゴヌクレオチドの既存の 3' ヒドロキシ機能を有する 3' 末端が直接第 2 種の有利にはホスホリル化して存在するオリゴヌクレオチドの 5' 末端に隣接するように、先行ステップで第 1 種のオリゴヌクレオチドの伸長が行われた場合、それによって連結生成物が得られる部分ステップ。 40

【 0 0 5 4 】

使用した第 1 種のオリゴヌクレオチド及び／又は使用した第 2 種のオリゴヌクレオチドが特に有利には塩基 T、A 及び C のみ又は塩基 T、A 及び G のいずれかを含有する。

【 0 0 5 5 】

この方法のさらに有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上のハイブリッド後に次の部分ステップが実施される：

(a) 増幅ゲノム DNA が二重鎖の形成下に n ヌクレオチドの既知の配列を有する少なくとも 1 個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端で一部又は全部前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノム DNA プローブ内で調査されるべき位置にハイブリッドされる部分ス 50

テップ。

(b) オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの3'末端であらかじめ塩基欠損対なしに被検位置にハイブリッドされる場合に、ポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、少なくとも1個のヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【0056】

PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が検出のために特に有利には検出可能な標識を有する。

【0057】

好ましくは、PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物の標識が蛍光標識、放射性核種又は質量分析計で検出される分離可能な質量標識である。

【0058】

PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が好ましくは全体で質量分析計で検出することができ、それによって前記生成物の質量により明確に特徴づけられる。

【0059】

特に、有利にはPCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物の各1個のフラグメントが質量分析計で検出される。

【0060】

PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物のフラグメントが、有利には1個又は複数個のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる消化によって生成される。

【0061】

質量分析計でのより良い検出性のために、生成されたフラグメントが特に有利には個々の正又は負の実効電荷を有する。

【0062】

PCR生成物及び／又は伸長生成物及び／又は連結生成物が、好ましくはマトリックス助レーザー脱着／イオン化質量分析法(MALDI-TOF)を利用して、又は電子スプレー質量分析法(ESI)を利用して検出され、かつ可視化される。

【0063】

本方法は、有利には患者又は個体にとり不利な結果の診断及び／又は予測のために使用され、前記不利な結果が次のカテゴリ：望ましくない薬剤作用；癌罹患；CNS機能不全、障害又は疾病；攻撃性症候群又は挙動障害；脳障害の臨床的、心理学的及び社会的な帰結；精神性障害及び人格性障害；老年痴呆及び／又は連想症候群；心臓血管病、機能不全及び障害；胃腸域の機能不全、障害又は疾病；呼吸系の機能不全、障害又は疾病；負傷、炎症、感染、免疫及び／又は予後；発育過程中的の異常としての身体の機能不全、障害又は疾病；皮膚、筋肉、結合組織又は骨の機能不全、障害又は疾病；内分泌及び代謝機能不全、障害又は疾病；頭痛又は性的機能不全の少なくとも1つに属している。

【0064】

さらに、この新規の方法は、特に有利には細胞型、組織の区別又は細胞差異化の調査に利用される。

【0065】

さらに、本発明の目的は、重亜硫酸塩を含有する試薬と、変性試薬又は溶剤と、目録1記載の遊離基捕捉剤、増幅体の製造のためのプライマーと、アッセイの実施のための手引書とを含むキットである。

【0066】

目録1：

ジー、トリヒドロキシベンゼン、緑茶エキス(green tea extract)、ピクノゲノール(pine bark extract)、銀杏二葉エキス(EGb761)、種々の果実エキス及び野菜エキスのフラボノイド混合物(GNLD)、バイオノー

10

20

30

40

50

マライザ (Sun-O 社)、

D P P H (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、N D G A (ノルジヒドログ
アヤレート酸)、

トロロクス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、

2, 6 - ジ - t e r t - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - t e r t - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - t e r t - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - t e r t - ブチル - p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、ビタミン C、ビタミン E、ビタミン Q、ヒドロキノン、ウビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミン、タンニン、レチン酸化合物、G e - 1 3 2 ビスベータカルボキシエチル - ゲルマニウム - セスキオキシド、過酸化ジスムターゼ (S O D)、過酸化カタラーゼ、アルファ - ナフトフラボン、ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネート及び C u (I I) 誘導体、メベンダゾール、C S (クロロホルム溶解性) アルカロイド - エキス、

4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 2 - ナフトキノ、

4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 2 - ナフトキノ、

4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 2 - ナフトキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 1, 4 - ナフトキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロル - 1, 4 - ナフトキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ナフトキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ナフトキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 - ナフトキノ、

4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノ

、4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノ、

4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノ、

3 - ブロム - 4 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノ、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - インダン - 1, 3 - ジオン、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3, 4 - ジメトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン、3, 3 - ビー [2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 - イル、

2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 5, 5

- , 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-クロル-5, 5,
 , 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5,
 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-5
 , 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ
 、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-5, 5, 8, 8-テ
 トラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ、
 2-ブロム-3-(3-ブロム-5-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-5
 , 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ
 、
 2-ブロム-3-(3, 5-ジブロム-4-ヒドロキシフェニル)-5, 5, 8, 8-テ
 トラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4-アントラキノ、
 2-ブロム-3-(3-ブロム-5-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3
 -ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1, 4
 -アントラキノ、
 3-ブロム-2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-1, 4
 -アントラキノ、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,
 4-アントラキノ、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1
 , 4-アントラキノ、
 5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタリン-1, 3-ジ
 オール、
 3-メトキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタリ
 ン-1-オール、
 4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5, 6
 , 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、
 メチル-4-(3-クロル-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4
 , 5, 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸塩、
 4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)-
 安息香酸、
 メチル-(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-イル)
 -安息香酸、
 4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5
 , 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル)-安息香酸、
 メチル-4-(3-ヒドロキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタリン-2-
 イル-アゾ)-安息香酸塩、
 4-(3-ヒドロキシ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-1, 4-ジオキソ-1, 4, 5
 , 6, 7, 8-ヘキサヒドロアントラセン-2-イル-アゾ)-安息香酸、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサー-2, 5-ジエニリデン
)-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロシクロペンタ [b]
 ナフタリン-1, 2-ジオン、
 3-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサー-2, 5-ジエニリデン
)-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロアントラセン-3H
 -1, 2, 4-トリオン、
 2-(3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5,
 8-ジメチル-1, 4-ナフトキノ、

10

20

30

40

50

2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 8 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 - プロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ
 - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、

【 0 0 6 7 】

次の例が本発明を説明する。

【 0 0 6 8 】

例：

自動化された重亜硫酸塩反応の実施。

【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

50

本例において、抑制エンドヌクレアーゼを用いて製造者の指示にしたがって処理したゲノムDNAプローブの第V I I I遺伝子因子内のシトシンのメチル化状態の検出方法の適用を説明する。この方法は、交叉汚染を除外する交換可能のピペット測定先端部用に4つの独立した垂直移動式アダプトを備えた自動ピペット測定システム(MWG RoboSeq 4204)の使用に基づく。このピペット測定システムは、 $\pm 2 \mu\text{l}$ 以下の誤差を有する $100 \mu\text{l}$ のピペット測定を可能にする。自動ピペット測定システムの作業パレットは、ピペット測定先端部用の6架台と、8ピペット測定位置のうち2つが冷却できる前記8ピペット測定位置と、冷却式試薬架台と、10微量滴定パレット用の積層システムと、ピペット測定先端部監視ステーションと、アダプタからピペット測定先端部の分離用の装置とを装備している。自動ピペット測定システムは、シリアルインタフェースを介してコンピュータと接続されており、この方法の適用に必要な全てのピペット測定ステップの自由プログラミングを可能にするソフトウェアプログラムを介して制御される。

10

【0070】

第1方法ステップで、手動でDNAプローブの部分標本が微量滴定プレートの自由選択可能な96位置に滴定される。微量滴定プレートがそれに続きエッペンドルフパターンサイクラーの使用下に前処理DNAプローブの変性のために96℃に加熱される。次に微量滴定プレートを自動ピペット測定システム内へ移す。DNAを含む全ての位置で、プログラム制御されて順次試薬架台から変性試薬(ジオキサン)、ナトリウムヒドロゲンサルファイト溶液3.3モルの部分標本及び遊離基捕捉剤溶液の部分標本が使用した変性試薬内に加えてピペット測定される。それに続き、微量滴定プレートがエッペンドルフパターンサイクラー内でDNAプローブ内にナトリウムヒドロゲンサルファイトの作用下に全ての非メチル化シトシン残基が重亜硫酸塩付加物に転換されるまでインキュベートされる。

20

【0071】

重亜硫酸塩処理後、微量滴定プレートをサーモサイクラーから自動ピペット測定システム内へ移す。同じ型式の第2微量滴定プレートを前置きする。チャンバの第1微量滴定プレート上と同等の位置に重亜硫酸塩処理DNAプローブを含む全てのチャンバ内に、初めに塩基性トリス-HClバッファ(pH 9.5)を移し入れ、それに続き重亜硫酸塩処理DNAの部分標本を第2微量滴定プレートの対応する位置へ移し入れる。塩基性溶液内で非メチル化シトシン残基の重亜硫酸塩付加物がウラシル残基に転換される。

【0072】

重亜硫酸塩処理DNAの鎖(本例ではセンス鎖)の標的とした増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって行った。第1型(AGG GAG TTT TTT TTA GGG AAT AGA GGG A (SEQ-ID:1)及びTAA TCC CAA AAC CTC TCC ACT ACA ACA A (SEQ-ID:2))のプライマー対が使用されており、これは成功を収めた重亜硫酸塩処理DNA鎖の特異的増幅を可能にするが、DNA鎖の非メチル化シトシン残基がウラシル残基に転換されず、又は不完全に転換された前記DNA鎖の特異的増幅は可能にしない。PCR反応のために、自動ピペット測定システムで同じ型式の第3微量滴定プレートが前置きされる。チャンバの第1微量滴定プレート上と同等の位置に重亜硫酸塩処理DNAプローブを含む全てのチャンバ内で、初めにPCRバッファ、DNAポリメラーゼ及び第1型のプライマーを含む原液の部分標本が自動的にピペット測定される。その後、自動的に第2微量滴定プレートの各位置から希釈した重亜硫酸塩処理DNAの部分標本が、前記部分標本がPCR反応の実施のためにサイクラー内へ移される前に、対応する第3微量滴定プレートの位置へ移される。PCR生成物は、アガロースゲル電気泳動と、それに続き臭化エチジウムによる着色とによって同定される(図1)。図1は、重亜硫酸塩処理DNA鎖のPCR増幅したゲル図である(左図:分子量マーカー、右:PCR生成物)。

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、重亜硫酸塩処理DNA鎖のPCR増幅したゲル図である。

【 図 1 】



【 国際公開パンフレット 】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/98528 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/00 (31) Bestimmungsstaaten (national): AB, AO, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LI, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (31) Internationales Akteuzeichen: PCT/DB01/02274 (34) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (32) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 2001 (19.06.2001)
- (25) Klarschlagsprache: Deutsch (36) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 29 915.6 19. Juni 2000 (19.06.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): IFIGENOMICS AG (DE/DB); Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Aussender (nur für US): BERLIN, Kurt (DE/DB); Marienkirchweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens, Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
— mit dem Sequenzprotokoll der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. First, genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, 5-methylcytosine and cytosine reacting differentially. The pre-treated DNA is then amplified with primers from a different sequence using a polymerase. In the following step, the amplified genomic DNA is hybridized to an oligonucleotide array and PCR products are obtained which must be provided with an identifying mark. Alternatively, the PCR products can be extended in a Primer Extension Reaction, the extension products also being provided with an identifying mark. The last step involves examining the extended oligonucleotides for the presence of the identifying mark.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren. Anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase mit Primern unterschiedlicher Sequenz amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und PCR-Produkte erhalten, die mit einer Markierung versehen sein müssen. Alternativ können die PCR-Produkte in einer Primer Extension Reaktion verlängert werden, wobei auch die Verlängerungsprodukte mit einer Markierung versehen sind. Im letzten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/98528 A2

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

1

Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA.

10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

30 Eine relativ neue und die inzwischen am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

WO 01/58528

PCT/DE01/02274

2

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechinik, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

3

kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nät. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen.. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnick, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

4

hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

- 5 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungs-
fähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Ka-
ras, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ioni-
zation of proteins with molecular masses exceeding 10000
10 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in
eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen
kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Ana-
lytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert.
Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des
15 Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt
die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer
verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark
beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor frü-
her als größere.
- 20 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur A-
nalyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nuk-
leinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S.
[1995]), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ioniza-
25 tion Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Inno-
vations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren
ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für
Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überpro-
portional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ
30 geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF
Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent
wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind ei-
nige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die
35 eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es
zwar mittlererweile einige ansprechende Matrices, jedoch

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

5

5 wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht ver-
ringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert
werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass
sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnuklein-
10 säuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rück-
grats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich
durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale
DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedu-
re for selective DNA alkylation and detection by mass
15 spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die
Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA
resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den
gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein
weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte
20 Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den
Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von
Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen.
20 Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie
Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laborato-
ry Manual, 1989.

Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-
25 Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in
genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper
AA. (1998), Nucleic Acids Res. 26: 5009-5010).

Aufgabe der vorliegende Erfindung ist es daher eine Ver-
30 fahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA zur
Verfügung zu stellen, welches die Nachteile des Standes
der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass ein Verfahren zum
35 Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA zur Verfügung
gestellt wird, wobei man folgende Arbeitsschritte aus-

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

6

führt:

- a) eine genomische DNA-Probe wird mit einer Lösung eines Bisulfits (= Hydrogensulfit, Disulfit) im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 6 mol/l inkubiert, wobei ein denaturierendes Reagenz und/oder Lösemittel sowie mindestens ein Radikalfänger zugegeben ist;
- b) die behandelte DNA-Probe wird mit Wasser oder einer wässrigen Lösung verdünnt;
- c) die DNA-Probe wird in einer Polymerasereaktion amplifiziert;
- d) man detektiert, inwieweit sich die Sequenz durch die Behandlung nach Schritt a) gegenüber der genomischen DNA-Probe verändert hat und schließt auf den Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der genomischen DNA-Probe.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass das denaturierende Reagenz und/oder Lösungsmittel aus der folgenden Liste von Verbindungen oder Verbindungsklassen ausgewählt ist:

Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO, THF.

Bevorzugt ist dabei ferner, dass der Radikalfänger aus der folgenden Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist:

Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karbonsäure), 2,6-Di-tert-

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

7

- butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132
- 5 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavon, Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazol, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-
- 10 Extrakt,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon,
- 15 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon,
- 20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon,
- 25 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 30 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion,
- 35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

8

- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-
epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-
[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-
10 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
15 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
20 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-
anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-
anthrachinon,
25 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-
anthrachinon,
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-
diol,
3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
30 tetrahydronaphthalin-1-ol,
4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
35 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
benzoesäure,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

9

- Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
 5 Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[bl-naphthalin-1,2-dion,
 10 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion,
 15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 25 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 30 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

10

- 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 5 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 10 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 15 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 20 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.
 25
- Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei, dass man die gemischte DNA-Probe vor der Behandlung thermisch denaturiert.
- Besonders erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man den Schritt c) in zwei Teilschritten wie folgt durchführt:
 30 a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;
 35 b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

11

die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

5

Es ist erfindungsgemäß weiterhin bevorzugt, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.

10

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß außerdem, dass man für die Polymerasereaktion eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.

15

Besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man vor Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Desulfonierung der DNA durchführt.

Es ist auch bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

20

a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

25

(b) man das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

30

35

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

12

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausgeführt:

- 5 (a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende
10 unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das
15 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;
- 20 (b) man das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen,
25 wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und
30 das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten
35 Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

13

Dabei ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

Es ist außerdem erfindungsgemäß bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchende Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

Es ist auch erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen und/oder dass die Markierungen Radionuklide sind. Besonders bevorzugt ist es dabei, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbar Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

14

- Insbesondere ist es auch bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 5 Bevorzugt ist es erfindungsgemäß auch, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.
- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren ist bevorzugt auch dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.
- 15 Es ist weiterhin bevorzugt, dass man zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente mit einer einzelnen positiven oder negativen Nettoladung versieht.
- 20 Ganz besonders bevorzugt ist es, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.
- 25 Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch derart bevorzugt, in dem man die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 30
- 35

WO 01/98528

PCT/BR01/02274

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; Klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die vorliegende Erfindung stellt ein automatisierbares Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin bereit, welches

WO 01/98528

16

PCT/DE01/02274

nur Pipettierschritte enthält. Dadurch wird die Effizienz bestehender Verfahren in Bezug auf die Einfachheit der Handhabung, die Qualität, die Kosten und vor allem den Durchsatz verbessert.

5

Beschrieben wird ein automatisierbares Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin in genomischen DNA-Proben:

10 Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger
15 und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Im ersten Schritt des Verfahrens behandelt man die eingesetzte DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) derart, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine
20 hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.

25 Die genomische DNA-Probe denaturiert man besonders bevorzugt vor der Behandlung thermisch.

Wird für die Reaktion Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 und 6 mol/l verwendet, so findet an den
30 nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Für das erfindungsgemäße Verfahren müssen zudem ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein.

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

17

Dabei kommen als denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel bevorzugt die folgenden Verbindungen oder Verbindungsklassen in Frage:

- 5 Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.

- 10 Als Radikalfänger ist die Gruppe der in Liste 1 aufgelisteten Verbindungen oder deren Derivate vorzugsweise geeignet. Die anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil.

- 15 Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt.

- 20 Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäß gemacht.

- 25 Den Verfahrensschritt führt man vorzugsweise in zwei Teilschritten durch. Man beginnt mit einer PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, welche die vorbehandelte DNA Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben. Danach führt man eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz durch, die jeweils zu

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

18

einem Abschnitt der vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

- 5 Dabei ist es klar, dass derartige Präamplifikationen häufig nicht als PCR Reaktionen, sondern als Primerextensionsreaktionen ausgeführt werden, die keine hitzebeständige Polymerase erfordern.
- 10 Im letzten Verfahrensschritt detektiert man, inwieweit sich die Sequenz durch die Behandlung mit einem Bisulfit enthaltenen Reagenz gegenüber der genomischen DNA-Probe verändert hat und schließt auf den Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der genomischen DNA-Probe.
- 15 Für die Detektion werden die PCR-Produkte besonders bevorzugt auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert.
- 20 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:
- 25 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 30 (b) das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden wird mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.
- 35

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:

- 5
- (a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisier-
- 10
- ten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine
- 15
- zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten
- 20
- ausgewählten Position getrennt ist;
- (b) das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden wird mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die
- 25
- zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer
- 30
- Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im
- 35
- vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

20

Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt, welches bevorzugt phosphoryliert vorliegt.

5

Die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies enthalten besonders bevorzugt entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G.

10

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:

15

(a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

20

(b) das Oligonukleotid wird, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

25

30

Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte sind für die Detektion besonders bevorzugt mit einer nachweisbaren Markierung versehen.

35

Vorzugsweise sind die Markierungen der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte

WO 01/98528

21

PCT/DE01/02274

Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

- 5 Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte können vorzugsweise insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und sind somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert.
- 10 Besonders bevorzugt weist man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nach.
- 15 Das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts erzeugt man bevorzugt durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen.
- 20 Zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer weisen die erzeugten Fragmente besonders bevorzugt eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.
- 25 Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte detektiert und visualisiert man vorzugsweise mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI).
- 30 Das vorliegende Verfahren wird bevorzugt verwendet zur Diagnose und/oder Prognose von nachteiligen Ereignissen für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädi-
- 35

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

22

gungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; 5 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, 10 der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Das neue Verfahren dient ferner besonders bevorzugt zur 15 Unterscheidung von Zelltypen, Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, das ein Bisulfit enthaltenes Reagenz, denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel, sowie Radikalfänger gemäß 20 Liste 1, Primer zur Herstellung der Amplifikate und eine Anleitung zur Durchführung eines Assays enthält.

25 Liste 1:

Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener 30 Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), , Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- 35 karbonsäure),

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

.23

- 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavin, Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazol, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-Extrakt,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

24

- 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-
 [2- (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl,
 5 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 10 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 15 2-Brom-3- (3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2-Brom-3- (3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2-Brom-3- (3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
 20 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 3-Brom-2- (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon,
 25 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon,
 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol,
 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol,
 30 4- (3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
 Methyl-4- (3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
 35 4- (3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure,

WO 01/98528

25

PCT/BR01/02274

- Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
 5 Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion,
 15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-
 20 1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 25 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 30 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon,

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

26

- 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 5 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
 10 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
 15 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2- (3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 20 2- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 3- (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.
 25

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

- 30 Beispiel:
 Automatisierte Durchführung der Bisulfitreaktion.

- Im vorliegenden Beispiel wird die Anwendung des Verfahrens zum Nachweis des Methylierungsstatus von Cytosinen im Faktor VIII-Gen einer genomischen DNA-Probe, die mit einer Restriktionsendonuclease nach Angabe des Herstel-
- 35

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

27

lers behandelt wurde, beschrieben. Das Verfahren beruht auf dem Einsatz eines automatischen Pipettiersystems (MNG RoboSeq 4204) mit vier separat vertikal beweglichen Adaptoren für austauschbare Pipettierspitzen, die Kreuzkontaminationen ausschließen. Das Pipettiersystem ermöglicht das Pipettieren von 100µl mit einem Fehler von weniger als ±2µl. Die Arbeitsplatte des automatischen Pipettiersystems ist mit sechs Gestellen für Pipettierspitzen und acht Pipettierpositionen, von denen zwei gekühlt werden können, einem kühlbaren Reagenziengestell, einem Stapelsystem für 10 Mikrotiterplatten, einer Pipettierspitzenwaschstation und einer Vorrichtung zur Trennung der Pipettierspitzen vom Adaptor ausgerüstet. Das automatische Pipettiersystem ist über eine serielle Schnittstelle mit einem Computer verbunden und wird über ein Softwareprogramm, das die freie Programmierung aller für zur Anwendung des Verfahrens notwendigen Pipettierschritte erlaubt, gesteuert.

Im ersten Verfahrensschritt wird von Hand ein Aliquot der DNA-Probe in eine von 96 frei wählbaren Positionen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird anschließend unter Verwendung eines Eppendorf Mastercycler zur Denaturierung der vorbehandelten DNA-Probe auf 96°C erwärmt. Die Mikrotiterplatte wird dann in das automatische Pipettiersystem überführt. In alle Positionen, die DNA enthalten, werden programmgesteuert nacheinander aus dem Reagenziengestell Aliquots eines denaturierenden Agens (Dioxan), einer 3,3 molaren Natriumhydrogensulfitlösung, und einer Lösung eines Radikalfängers in dem verwendeten denaturierenden Agens hinzu pipettiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte im Eppendorf Mastercycler inkubiert, dass in der DNA-Probe unter Einwirkung des Natriumhydrogensulfits alle unmethylierten Cytosinreste in ein Bisulfitaddukt umgewandelt werden.

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

28

Nach der Bisulfitbehandlung wird die Mikrotiterplatte aus dem Thermocycler in das automatische Pipettiersystem überführt. Es wird eine zweite Mikrotiterplatte desselben Typs vorgelegt. In alle Kammern, deren äquivalente Position auf der ersten Mikrotiterplatte eine bisulfitbehandelte DNA-Probe enthält, wird zuerst ein basischer Tris-HCl Puffer (pH 9.5) und anschließend wird ein Aliquot der bisulfitbehandelten DNA in die entsprechende Position der zweiten Mikrotiterplatte übertragen. In der basischen Lösung werden die Bisulfitaddukte der nichtmethylierten Cytosinreste zu Uracilresten umgewandelt.

Die gezielte Amplifikation eines Stranges (im vorliegenden Beispiel der sense-Strang) der bisulfitbehandelten DNA erfolgt durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR). Es wird ein Primerpaar des Typs 1 (AGG GAG TTT TTT TTA GGG AAT AGA GGG A (SEQ-ID:1) und TAA TCC CAA AAC CTC TCC ACT ACA ACA A (SEQ-ID:2)) verwendet, das die spezifische Amplifikation eines erfolgreich bisulfitbehandelten DNA-Strangs, nicht jedoch eines DNA-Strangs, dessen nichtmethylierte Cytosinreste nicht oder unvollständig in Uracilreste umgewandelt wurden, erlaubt. Für die PCR-Reaktion wird im automatischen Pipettiersystem eine dritte Mikrotiterplatte desselben Typs vorgelegt. In alle Kammern, deren äquivalente Positionen auf der ersten Mikrotiterplatte eine bisulfitbehandelte DNA-Probe enthält, wird zuerst ein Aliquot einer Stammlösung, die einen PCR-Puffer, eine DNA-Polymerase und Primer des Typs 1 enthält, automatisch pipettiert. Danach wird automatisch aus jeder Position der zweiten Mikrotiterplatte ein Aliquot der verdünnten bisulfitbehandelten DNA in die entsprechende Position der dritten Mikrotiterplatte übertragen, bevor diese zur Durchführung der PCR-Reaktion in den Cycler überführt wird. Das PCR-Produkt wird durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Anfärbung mit Ethidiumbromid identifiziert (Fig. 1). Figur 1 zeigt das Gel-

WO 01/98528

PCT/DE01/02274

29

bild eines PCR-amplifizierten bisulfidbehandelten DNA-Stranges (links: Molekulargewichtsmarker, rechts: PCR-Produkt)

5

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in
DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende
Arbeitsschritte ausführt:
- a) eine genomische DNA-Probe wird mit einer Lösung
eines Bisulfit (= Hydrogensulfit, Disulfit) im Kon-
zentrationbereich zwischen 0,1 und 6 mol/l inkubiert,
wobei ein denaturierendes Reagenz und/oder Lösungsmittel
sowie mindestens ein Radikalfänger zugegen ist;
- b) die behandelte DNA-Probe wird mit Wasser oder einer
wässrigen Lösung verdünnt;
- c) die DNA-Probe wird in einer Polymerasereaktion
amplifiziert;
- d) man detektiert, inwieweit sich die Sequenz durch
die Behandlung nach Schritt a) gegenüber der genomischen
DNA-Probe verändert hat und schliesst auf den
Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der
genomischen DNA-Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass das denaturierende Reagenz und/oder Lösungsmittel
aus der folgenden Liste von Verbindungen oder
Verbindungsklassen ausgewählt ist:
- Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte
Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril,
primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole,
Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether,
Tetraethylenglykol-dialkylether, Pen-

taethylenglykoldiakylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO, THF.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Radikalfänger aus der folgenden Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist:
- Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), Bio-Normaliser (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karbonsäure), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavin, , Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-Extrakt,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-

WO 01/98528

32

PCT/DE01/02274

- naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-
 naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-
 naphthochinon,
 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-
 anthrachinon,
 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-
 anthrachinon,
 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 indan-1,3-dion,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-
 naphthalin-1-on,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-
 on,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on,
 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-
 1-on]-3-yl,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-
 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
 anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
 anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-

WO 01/58528

33

PCT/DE01/02274

- anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
 anthrachinon,
 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-
 hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
 anthrachinon,
 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-
 anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-
 anthrachinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-
 anthrachinon,
 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-
 diol,
 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
 tetrahydronaphthalin-1-ol,
 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
 hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
 Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
 benzoesäure,
 Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-
 yl)-benzoesäure,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
 Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-
 2-yl-azo)-benzoat,
 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-

5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-
1,2,4-trion,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
10 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
20 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
25 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
30 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
35 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-

- methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-
 methyl-1,4-naphthochinon,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-
 5 methyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-
 dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
 5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 10 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-
 dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-
 dimethyl-1,4-naphthochinon,
 15 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-
 dimethyl-1,4-naphthochinon.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet, dass man die genomische DNA-
 Probe vor der Behandlung thermisch denaturiert.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass
 man den Schritt c) in zwei Teilschritten wie folgt
 durchführt:
- 25 a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem
 Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine
 nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch
 hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein
 Amplifikat ergeben;
- 30 b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation
 gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Se-
 quenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach An-
 spruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-
 35)-Strang] identisch oder komplementär sind und die zu
 amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

WO 01/58528

36

PCT/DE01/02274

- 5 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Polymerase-reaktion eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man vor Schritt c) des Anspruchs 1 eine Desulfonierung der DNA durchführt.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 25 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 30 (b) man das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in
- 35 der genomischen DNA-Probe abhängt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausgeführt:

5
10
15
20
(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

25
30
(b) man das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

35
(c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies

- verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:
- (a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind,
- (b) man das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung von Methylierung

WO 01/58528

39

PCT/DE01/02274

rungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

- 5 13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht.
- 10 14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 15 15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 20 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.
- 25 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.
- 35 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch

Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass man zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente mit einer einzelnen positiven oder negativen Nettoladung versieht.
21. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.
22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei man die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeits-

- störungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung, Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen, endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
25. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

WO 01/58528

PCT/JP01/02274

1/1

Fig. 1



WO 01/58328

PCT/DE01/02274

1

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Epigenomics AG
<120> Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen
<130> E01/1204/WO

10 <140>
<141>
<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 28
<212> DNA
20 <213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

25 <400> 1
aggaggtttt ttttaggga tagagga 28

<210> 2
30 <211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
<400> 2
taatccaaa acctctccac tacaacaa 28

【 国際公開パンフレット（コレクトバージョン） 】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/098528 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68, G01N 33/50
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE91/02274
- (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 2001 (19.06.2001)
- (25) Erfindungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 19. Juni 2000 (19.06.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPIGENOMICS AG (EPIDR); Kantienallen 2d, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinders: und
- (73) Erfinders/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt (DL/DL); Marienburgerweg 4, 14532 Stahnsdorf (DL).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klement; Neue Frommstraße 5, 10176 Berlin-Mitte (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), australisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht: mit internationalem Rechenzeichenbericht vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (86) Veröffentlichungsdatum des internationalen Rechenzeichenberichts: 28. November 2002
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gassee verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VIRIAHIN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. First, genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, 5-methylcytosine and cytosine reacting differently. The pre-treated DNA is then amplified with primers from a different sequence using a polymerase. In the following step, the amplified genomic DNA is hybridized to an oligonucleotide array and PCR products are obtained which must be provided with an identifying mark. Alternatively, the PCR products can be extended in a Primer Extension Reaction, the extension products also being provided with an identifying mark. The last step involves examining the extended oligonucleotides for the presence of the identifying mark.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren. Anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase mit Primern unterschiedlicher Sequenz amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA auf einen Oligonukleotid-Array hybridisiert und PCR-Produkte erhalten, die mit einer Markierung versehen sein müssen. Alternativ können die PCR-Produkte in einer Primer-Extension-Reaktion verlängert werden, wobei auch die Verlängerungsprodukte mit einer Markierung versehen sind. Im letzten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/098528 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/DE 01/02274
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 21, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	1-3, 7, 8, 22-25
Y	page 5009, column 2, paragraph 2 --- -/-	4-6, 9-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document has been published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to indicate the publication date of another claim or other special reason (see specification) "O" document referred to in oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" late document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 September 2002		07/10/2002
Name and printing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6016, Postfach 2 600 60 Frankfurt am Main, Germany Tel. (+49-69) 640-2440, Telex 31 661 apa de, Fax: (+49-69) 640-2440		Authorized officer Bradbrook, D

Form PCT/IS0210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/DE 01/02274
C. (Continued on) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 13, 1997, pages 2619-2622, XP002210105 ISSN: 0008-5472 abstract Materials and Methods	5,6
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENONICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	4,9-21
Y	US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25 July 1989 (1989-07-25) column 3, line 31 - line 53	12-15
Y	LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 241, no. 4869, 26 August 1988 (1988-08-26), pages 1077-1080, XP000676556 ISSN: 0036-8076 abstract	10,11, 13-15
Y	GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (MS-SNUPe)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 abstract; figure 1	9-11, 13-15
Y	HERMAN J B ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CpG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 abstract; table 1	12-15

-/--

Form PCTABSTRACT (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/DE 01/02274
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 4, 1995, pages 675-682, XP002210106 ISSN: 0305-1048 abstract	9-15
A	CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2990-2997, XP002210107 ISSN: 0305-1048 Materials and Methods	1-25

Form PCT/ISA(2001) (continuation of second sheet) (July 2000)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int. Application No. PCT/DE 01/02274	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9928498	A	10-05-1999	DE 19754482 A1	01-07-1999	
			AT 217348 T	15-05-2000	
			AU 2408589 A	16-06-1999	
			CA 2310384 A1	10-06-1999	
			CN 1283235 T	07-02-2001	
			WO 9928498 A2	10-06-1999	
			DE 59804090 D1	13-06-2002	
			DK 1034309 T3	26-08-2002	
			EP 1034309 A2	13-09-2000	
			HU 0100424 A2	28-06-2001	
			JP 2001525181 T	11-12-2001	
			PL 341681 A1	23-04-2001	
			US 6214556 B1	10-04-2001	
US 4851331	A	25-07-1989	NONE		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Info siehe Anmerkungen PU/UE 01/02274
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68 G01N33/69		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) unter der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Forschungsfeld: Molekularbiologie (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12Q		
Forscherteile aber nicht zum Mindestprinzip gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, MPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGEREBENE UNTERLIEGEN		
Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in der Tabelle kommenden Teile	Bek. Anspruch Nr.
X	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 21, 1. November 1998 (1998-11-01), Seiten 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	1-3,7,8, 22-25
Y	Seite 5009, Spalte 2, Absatz 2 — — —	4-6,9-21
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders befriedigend erachtet ist "B" Keine Dokumente, die jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "C" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei zu bestätigen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum eines anderen in der internationalen Recherche befindlichen Erfindungsgegenstandes festgelegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) "D" Veröffentlichung, die sich auf eine erfindungswidrliche Erfindung, eine Erfindung, die eine Anwendung oder andere Maßnahmen betrifft "E" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem bevorzugten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"F" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht korrespondiert, sondern nur das Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angibt "G" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungswidrlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "H" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungswidrlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht wird und die beanspruchte Erfindung in der Veröffentlichung nicht als auf erfindungswidrlicher Tätigkeit beruhend betrachtet wird "I" Veröffentlichung, die die Erfindung des Erfinders betrifft		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 16. September 2002		Abschlußdatum des internationalen Rechercheberichts 07/10/2002
Name und Postanschrift der herausgebenden Recherchebehörde European Patent Office, P.O. Box 1, 5010 Paris Tel. +33-1-72 40 40 40, Fax. +33-1-72 40 40 40		Bevollmächtigter Bevollmächtigter Bradbrook, D

Formblatt PCT/EA/02 (Stand 1. Juli 1997)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Insa rundes Aktenzeichen PCT/DE 01/02274
E.(Fortsetzung) ALB WERTEILICH ANGESCHENNE UNTERLAGEN		
Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Seit. Anspruch Nr.
Y	WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas." CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 13, 1997, Seiten 2619-2622, XP002210105 ISSN: 0008-5472 Zusammenfassung Materials and Methods	5,6
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SWE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument	4,9-21
Y	US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25. Juli 1989 (1989-07-25) Spalte 3, Zeile 31 - Zeile 53	12-15
Y	LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, Bd. 241, Nr. 4869, 26. August 1988 (1988-08-26), Seiten 1077-1080, XP000676556 ISSN: 0036-8075 Zusammenfassung	10,11, 13-15
Y	GONZALEZ M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung; Abbildung 1	9-11, 13-15
Y	HERMAN J B ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CpG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung; Tabelle 1 -/-	12-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int nales Aktenzeichen PCT/DE 01/02274
C/(Perfektion) ALS WESSENTLICH ANGEZEIGTE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich ist die Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
Y	ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 4, 1995, Seiten 675-682, XP002210106 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung	9-15
A	CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 15, 1994, Seiten 2990-2997, XP002210107 ISSN: 0305-1048 Materials and Methods	1-25

Formblatt PCT/DA/210 (Fortsetzung von Blatt 1) (Juli 2002)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				In: siehe Abzweigzeichen PCT/DE 01/02274	
Im Recherchenbereich eingeführtes Patentschutzrecht	Datum der Veröffentlichung	Mithilfe/ort der Patentschutzrechte		Datum der Veröffentlichung	
WO 9928498	A	10-06-1999	DE	19754482 A1	01-07-1999
			AT	217348 T	15-05-2002
			AU	2408599 A	16-06-1999
			CA	2310384 A1	10-06-1999
			CN	1283235 T	07-02-2001
			WO	9928498 A2	10-06-1999
			DE	59804090 D1	13-06-2002
			DK	1034309 T3	26-08-2002
			EP	1034309 A2	13-09-2000
			HU	0100424 A2	28-06-2001
			JP	2001525181 T	11-12-2001
			PL	341681 A1	23-04-2001
			US	6214556 B1	10-04-2001
US 4851331	A	25-07-1989	KEINE		

Formblatt PCT/IB-A210 (Kuhang Patentschrift) (Juli 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/58

C 1 2 N 15/00

A

(81)指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム (参考) 4B063 QA01 QA17 QA19 QA20 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR52 QR56

QR64 QS25 QS34 QX02 QX07 QX10